



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Síntesis y propiedades de compuestos anticancerígenos
fotomodulables

Autor/es

DIANA FERNÁNDEZ MARTÍNEZ

Director/es

DIEGO SAMPEDRO RUIZ

Facultad

Escuela de Máster y Doctorado de la Universidad de La Rioja

Titulación

Máster Universitario en Química y Biotecnología

Departamento

QUÍMICA

Curso académico

2017-18



Síntesis y propiedades de compuestos anticancerígenos fotomodulables, de
DIANA FERNÁNDEZ MARTÍNEZ

(publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative
Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.

Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los
titulares del copyright.

© El autor, 2018

© Universidad de La Rioja, 2018

publicaciones.unirioja.es

E-mail: publicaciones@unirioja.es

Trabajo de Fin de Máster

SÍNTESIS Y PROPIEDADES DE COMPUESTOS ANTICANCERÍGENOS FOTOMODULABLES

Autor:

Diana Fernández Martínez

Tutor/es: Diego Sampedro Ruíz

MÁSTER:

Máster en Química y Biotecnología (760M)

Escuela de Máster y Doctorado



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**

AÑO ACADÉMICO: 2017/2018



SÍNTESIS Y PROPIEDADES DE COMPUESTOS ANTICANCERÍGENOS FOTOMODULABLES

Universidad de La Rioja
Facultad de Ciencia y Tecnología
Departamento de Química
Curso 2017/2018



Diana Fernández Martínez
Máster en Química y Biotecnología
Tutor:
Diego Sampedro Ruíz

Índice

Abreviaciones.....	3-4
1. Resumen.....	5-6
2. Introducción.....	7-9
3. Antecedentes.....	10-18
3.1. Fotofarmacología.....	11-14
3.2. Interruptores moleculares.....	14-15
3.3. Tipos de interruptores moleculares.....	15-16
3.4. Aplicaciones de los interruptores moleculares.....	16-18
4. Objetivos.....	19-20
5. Discusión y desarrollo de los resultados.....	21-36
5.1. Preparación de derivados del metronidazol.....	22-25
5.2. Estudio fotoquímico de los interruptores moleculares.....	25-28
5.3. Estudio computacional.....	29-32
5.4. Ensayos biológicos de los interruptores moleculares.....	32-36
6. Conclusiones.....	37-38
7. Experimental.....	39-70
7.1. Consideraciones generales.....	40-41
7.2. Descripción de los interruptores moleculares basados en el metronidazol.....	41-55
7.3. Descripción detallada de los ensayos biológicos.....	55-62
8. Anexo.....	63-72

Abreviaciones

δ Desplazamiento químico

λ Longitud de onda

μL Microlitro

$^1\text{H RMN}$ Resonancia Magnética Nuclear de protón

$^{13}\text{C RMN [H]}$ Resonancia Magnética Nuclear de carbono-13

A549 Línea celular de células epiteliales basales alveolares adenocarcinómicas

Ac Acetilo

AcCl Cloruro de acetilo

AcOEt Acetato de etilo

d Doblete

dd Doblete de dobletes

EM Espectrometría de masas

ES-MS (+) Espectrometría de masa en modo ion positivo.

Et Etilo

EtOH Etanol

FBS Suero fetal bovino

g Gramo

h Hora

HeLa Línea celular derivada de cáncer cérvico uterino

Hz Herzio

IC₅₀ Índice de concentración media de máxima inhibición

J Constante de acoplamiento

m Multiplete

M Molaridad

Me Metilo

MeOH Metanol

mg Miligramo

MHz Megahertzio

min Minuto

mL Mililitro

mmol Milimol

nm Nanómetro

ppm Parte por millón

R Sustituyente proveniente de los aldehidos

RMN Resonancia Magnética Nuclear

RPMI Roswell Park Memorial Institute

r.t. Temperatura ambiente

s Singlete

t Triplete, tiempo

1.Resumen.

Resumen

En este trabajo de fin de máster se lleva a cabo la preparación de nuevos compuestos fotoactivos con propiedades anticancerígenas que puedan ser reguladas por efecto de la luz. Estos compuestos están basados en la estructura del antibiótico metronidazol.

Tras llevar a cabo su síntesis se realiza un estudio fotoquímico de estos para comprobar si pueden ser utilizados como interruptores moleculares. Se pretende controlar la capacidad de afectar a la proliferación celular mediante un estímulo externo fácil de usar y no dañino, por lo que a su vez se llevan a cabo una serie de ensayos biológicos para comprobar su efecto anticancerígeno.

Abstract

In this work, the preparation of new photoactive compounds with anticancer properties that could be regulated by light is carried out. These compounds are based on the structure of the antibiotic called metronidazole.

After carrying out their synthesis, a photochemical study was made to verify if they can be used as molecular switches. It is intended to control the ability to affect cell proliferation through an easy-to-use and non-harmful external stimulus, so in turn a series of biological tests are carried out to check their anticarcinogenic effect.

2.Introducción.

La fotoquímica es el estudio de las reacciones químicas iniciadas por la luz y es tan amplia como la ciencia propia. La palabra *radiación* proviene del nombre del dios del sol egipcio, Aton Ra. A su vez, el hombre también reconoció los efectos medicinales del sol; de la antigua ciencia médica india encontramos que los leprosos eran tratados con pigmentos fotosensibilizadores procedentes de plantas y de los países del Medio Oriente se destacaba el uso de furocumarinas para teñir la piel de personas albinas.¹Aunque sin duda lo más importante es el papel de la luz en el desarrollo de la vida en la tierra y así el ejemplo más destacable de reacción fotoquímica es la fotosíntesis, donde la materia inorgánica se transforma en orgánica. Para llevar a cabo esta tarea la fuente de energía empleada es la luz solar, una fuente de energía renovable y económica.

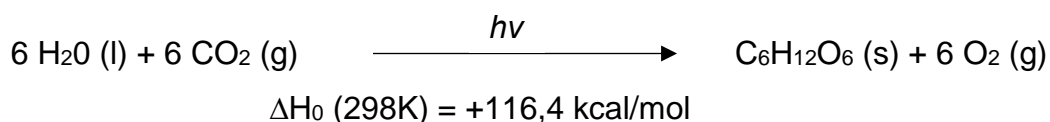


Fig 1. Esquema simplificado del proceso de la fotosíntesis.

Aunque el inicio de la fotoquímica orgánica se le atribuye a Trommsdorff en 1834, quién observó que los cristales de α -santonina al ser expuestos a la luz cambiaban de color. Posteriormente se vio que esta transformación se debía a un proceso de isomerización.²

Por otro lado, la luz da lugar a diversos procesos biológicos, como la fotosíntesis de la que ya se ha hablado al principio de la introducción, también ayuda a fijar el calcio en los huesos a través de la vitamina D y, es esencial para el desarrollo de la visión de los seres vivos. Todo esto ocurre gracias a la presencia de fotoproteínas las cuales contienen una parte de su estructura responsable de la interacción de la proteína con la luz y la consiguiente absorción de luz visible, que al recibir el estímulo de la luz experimentan un cambio conformacional o estructural. A dicha parte de la proteína se la denomina cromóforo, el cual debido a sus propiedades electrónicas absorbe luz a una determinada longitud de onda

¹ D. C. Neckers, *Selected papers on photochemistry*, Bowling Green State University, January, **1993**, 17-31.

² H. Trommsdorf, *Ann. Chem. Pharm.* **1834**, 11, 190-208.

que es dependiente de la estructura. Así, el control fotoquímico de los procesos biológicos es el resultado de la excitación fotoquímica y la reacción posterior que se da lugar a través del cromóforo.

El proceso que tendría lugar es el siguiente: la proteína es irradiada con una longitud de onda a la cual el cromóforo absorbe un fotón y pasa del estado fundamental (S_0) a un estado electrónico excitado, a través del cual se produce la reacción fotoquímica dando lugar al producto o productos correspondientes. Mediante las reacciones fotoquímicas se pueden llevar a cabo procesos como:

- Ruptura de enlaces.
- Formación de nuevos enlaces.
- Isomerización del doble enlace del cromóforo.

En este trabajo se desarrollará el estudio realizado sobre el proceso de isomerización de dobles enlaces de distintos cromóforos. Además, estos cromóforos están basados en la estructura del antibacteriano metronidazol por lo que también se estudiará su fotorreactividad así como la síntesis de dichos compuestos.

3. Antecedentes.

3.1. Fotofarmacología.

El nacimiento de la fototerapia ocurrió hace casi 200 años. Niels Finsen había estado tratando lupus vulgar (manifestación cutánea de la tuberculosis) mediante helioterapia, es decir, la exposición controlada de sus pacientes a la luz solar. Dada la naturaleza voluble de la luz solar, Finsen inició una colaboración con un ingeniero que fue víctima de *lupus vulgaris* y diseñó una fuente de luz artificial para el tratamiento conveniente de pacientes.³ Este evento marcó el nacimiento de la fototerapia moderna, pues sin la manipulación fácil y las diversas fuentes de luz medidas, la variedad de las fototerapias actuales no podrían ser administradas.

Los esfuerzos pioneros de Finsen en la aplicación de luz y luz artificial en particular, le valió el Premio Nobel de Medicina en 1903. Así pues, el desarrollo de fuentes artificiales ha seguido desempeñando un papel crucial en la fotomedicina.

En los años 50, Aaron Lerner se quedó fascinado por el 8-MOP (8-Metoxipsoraleno), una sustancia biológicamente inerte de forma natural que podía ser activada por la luz del sol para convertirse en un potente fotosensibilizador.

Una publicación seminal de Lerner y sus colaboradores en 1953 estableció que el 8-MOP se podía administrar con seguridad a los seres humanos; fue eficaz en dosis bajas en el manejo del vitiligo, y se planteó la posibilidad de que la energía ultravioleta activara al 8-MOP a una forma intermediaria responsable de la potencia biológica de la matriz molecular.

Ese papel creó un gran interés e inició la era moderna de la terapia fotofarmacológica.⁴

³ N Finsen : Phototherapy. London, Edward Arnold, **1901**; también Giese AC: Living With Our Sun's Ultraviolet Rays. New York, Plenum Press, **1976**.

⁴ F. P. Gasparro, G. Chan, R. I. Edelson, *Yale J Biol Med*, **1985**, 58, 519-534.

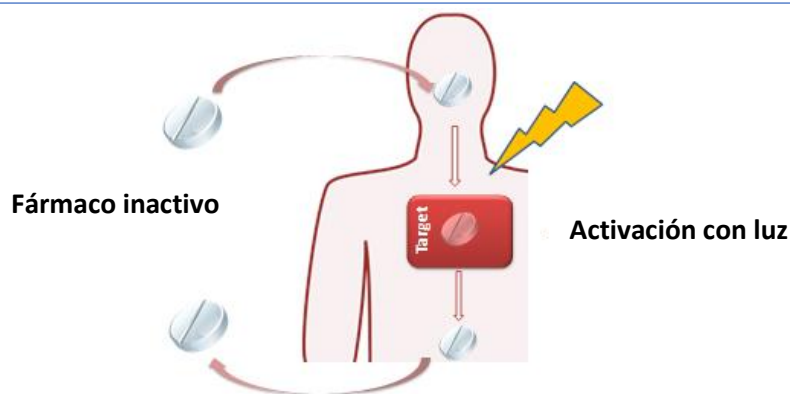


Fig 2. Esquema de la terapia fotofarmacológica.⁵

La farmacoterapia ofrece la posibilidad de curar enfermedades y aliviar síntomas a través de la administración de fármacos^{6,7}, mejora la calidad de vida y ha contribuido a lo que es hoy nuestro mundo. Sin embargo, hay muchos problemas relacionados con los fármacos que son la principal preocupación de la sociedad. La pobre selectividad de estos puede derivar en efectos tóxicos, pero la complicación más obvia es la resistencia a ellos (Figura 3). Estos efectos disminuyen el potencial y limitan la aplicación de la farmacoterapia. Así pues, el aumento del impacto de la farmacoterapia requiere de la exploración y el establecimiento de nuevos paradigmas moleculares hacia el aumento de la selectividad de los fármacos.

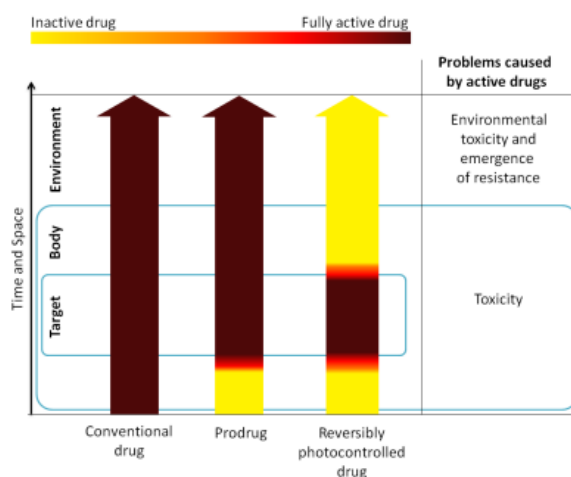


Fig. 3. La actividad de un fármaco convencional, un profármaco y un fármaco reversiblemente fotocontrolado; con el tiempo y el espacio.

⁵ W. A. Velema, W. Szymanski, B. L. Feringa, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 2178-2191.

⁶ L. S. Goodman, Gilman's the pharmacological basis of therapeutics; Pergamon Press New York: **1990**; Vol. 1157.

⁷ M.A Chisholm-Burns; B.G Wells.; T. L. Schwinghammer; P. Malone; J. Kolesar; J. Rotschafer; J. Dipiro. Pharmacotherapy principles & practice; McGraw-Hill: **2010**.

Para el fármaco convencional, la actividad está presente en todo el cuerpo del paciente durante el tiempo que está presente pudiendo causar efectos adversos; a su vez después de la excreción, la concentración del fármaco activa puede tener un efecto negativo sobre el medio ambiente y/o llevar a la aparición de resistencia a los fármacos en patógenos. Algunos efectos adversos pueden evitarse usando profármacos, que liberen la sustancia activa en una etapa posterior y evitarse completamente con fármacos cuya actividad pueda ser controlada reversiblemente en espacio y tiempo.

La luz ofrece oportunidades incomparables como elemento regulador no invasivo en aplicaciones biológicas. En primer lugar, muestra un gran nivel de ortogonalidad hacia la mayor parte de sistemas químicos y bioquímicos. En contraste con los productos químicos que se usan para regular procesos biológicos, los fotones no causan la contaminación del objeto estudiado y tiene la toxicidad baja o insignificante. En segundo lugar, puede ser entregada con una precisión espacial y temporal muy alta, que es de principal importancia para controlar la acción de compuestos fotoactivos. Finalmente, la luz puede ser regulada de una manera cualitativa y cuantitativa ajustando la longitud de onda e intensidad respectivamente.

Nace pues la fotofarmacología, que tiene como objetivo resolver el problema de la mala selectividad de los fármacos mediante la incorporación de grupos fotomodulables en la estructura molecular de compuestos bioactivos. Estos moduladores son compuestos que mediante la absorción de un fotón pueden experimentar un cambio reversible en su estructura y propiedades.

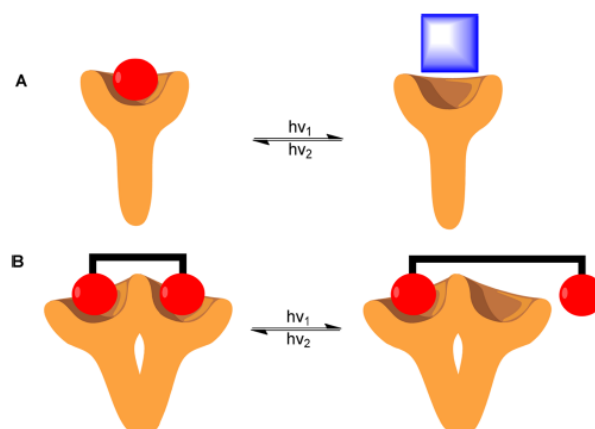


Fig. 4. Representación esquemática de dos estrategias para diseños fotofarmacéuticos. (A) Cambio de propiedades al irradiar. (B) La

fotoisomerización cambia la distancia del enlace previniendo la interacción multivalente en un estado.⁵

El tratamiento fotofarmacológico es especialmente adecuado en situaciones donde la enfermedad está localizada. La acción sobre las partes expuestas, como la piel o los ojos, parece el blanco más natural. Sin embargo, los avances en el diseño de los fotomoduladores hacen cada vez más viable tratar otras zonas localizadas, tales como infecciones y tumores sólidos.

Para dar lugar a la terapia fotofarmacológica, primero debe seleccionarse el fotointerruptor de forma que no esté asociado a fototoxicidad y que pueda dar lugar a varios ciclos. Su selección depende del sistema biológico y de la aplicación, en algunos casos será más efectivo usar un interruptor que espontáneamente vuelva a su forma inactiva después de cesar la irradiación sobre él o un interruptor que requiera una longitud de onda para ser activado y otra para desactivarse.

La situación ideal se daría si un isómero absorbiese con una alta absorptividad (ϵ) a una longitud de onda donde el otro fuese completamente transparente y viceversa.

Una vez elegido el mejor interruptor debe ser incorporado a la molécula de forma que no reduzca su actividad, por ello deben estudiarse las interacciones entre el fármaco y el interruptor seleccionado.⁸

3.2. Interruptores moleculares

Los interruptores moleculares son moléculas que pueden ser interconvertidas mediante energía externa entre dos estados, encendido y apagado, lo que conlleva a su vez un cambio en sus propiedades.

Concretamente los interruptores moleculares basados en la estimulación fotoquímica son los que se encuentran relacionados con las terapias fotofarmacológicas. El uso de la luz como fuente externa se debe a la gran

⁸ J. Broichhagen, J. A. Frank, D. Trauner, *Acc. Chem. Res.*, **2015**, 48, 1947-1960.

cantidad de ventajas, que ya se han explicado con anterioridad, frente a otros estímulos como por ejemplo estímulos químicos, físicos, electroquímicos...

Debido a todas estas ventajas se han estudiado gran variedad de sistemas en los que la estimulación con luz ejerza un cambio sobre ellos, un ejemplo es la reacción de fotoisomerización de dobles enlaces en la estructura de los interruptores moleculares. En este trabajo, la reacción de fotoisomerización de un doble enlace parte del isómero *E* para dar el *Z*.

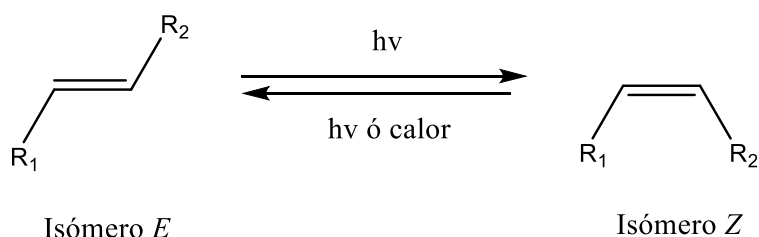


Fig. 5. Representación esquemática de la fotoisomerización de un interruptor molecular *E/Z*.

3.3. Tipos de interruptores moleculares.

Se pueden distinguir diferentes tipos según la reacción que llevan a cabo: pueden darse interruptores moleculares que den reacciones de isomerización *E/Z* o reacciones de ciclación. Un ejemplo de interruptores moleculares utilizados en procesos de fotociclación son diariletenos, espiropiranos y dihidroazulenos.

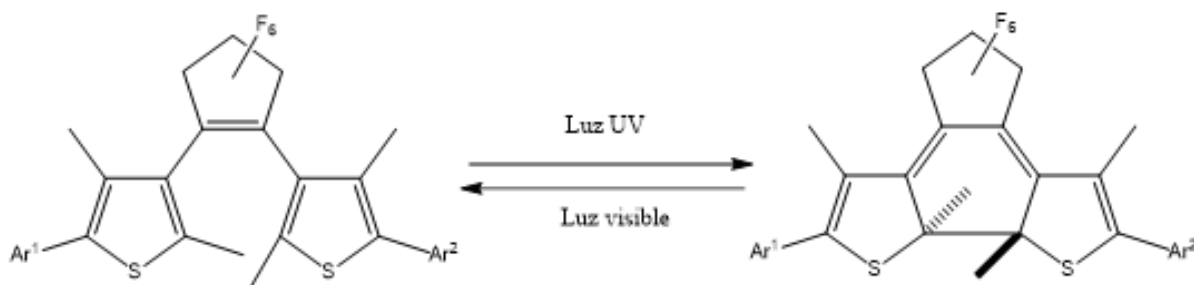


Fig. 6. Proceso de fotociclación de un diarilieteno en el que cambian su estructura de la forma abierta (incolores) a la forma cerrada (coloreada) en presencia de radiación UV.⁹

⁹ M. Bossi, V. Belov, S. Polyakova, S. W. Hell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7462 –7465.

Por el contrario, en este trabajo se llevará a cabo el estudio de interruptores basados en la isomerización *E/Z* entre los que se puede destacar tres grupos:

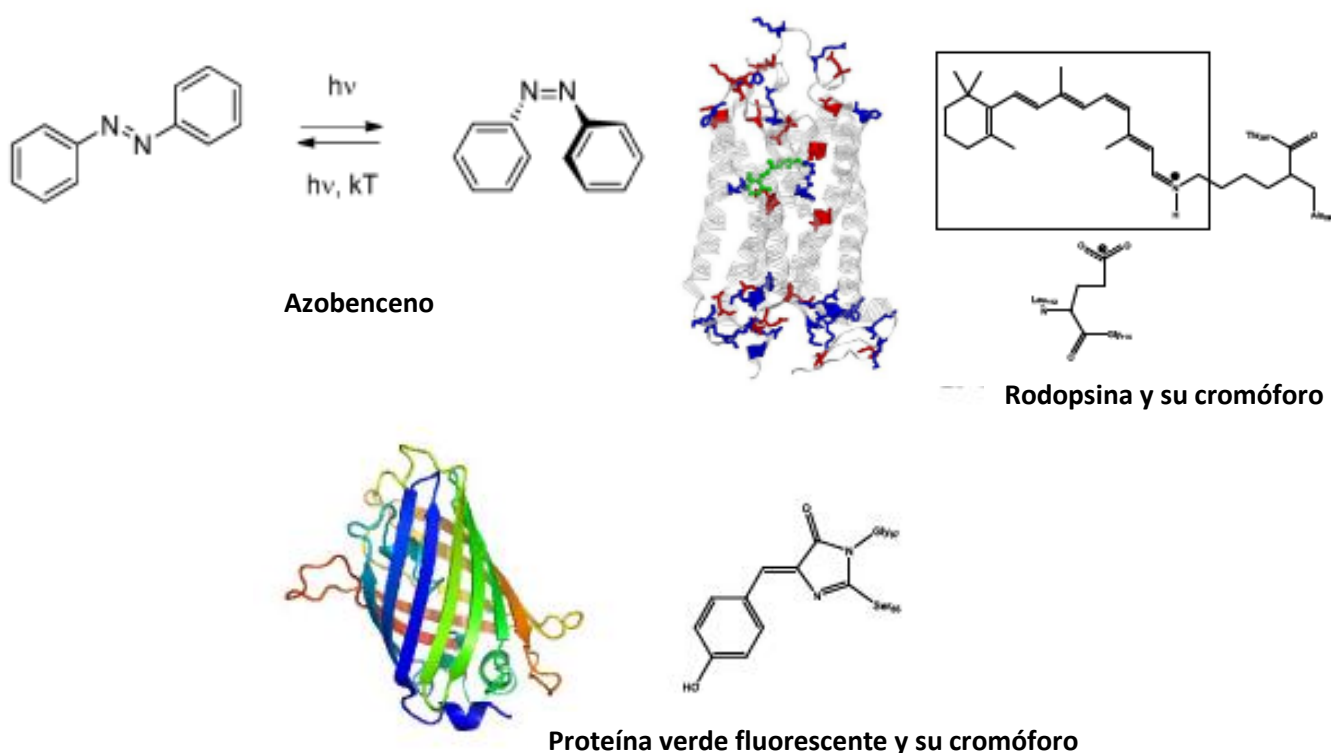


Fig. 7. Grupo de interruptores basados en isomerización *E/Z*.

3.4. Aplicaciones de los interruptores moleculares.

Los interruptores moleculares poseen multitud de aplicaciones. En biología, la introducción de estos en proteínas y péptidos da lugar al fotocontrol de la conformación.¹⁰ Por otro lado, los alquenos impedidos pueden ser utilizados como sistemas moleculares de almacenamiento de datos.¹¹ Otra aplicación es el almacenamiento de energía solar, esta se debe a una isomerización inducida por luz a un isómero metaestable que puede ser usado para almacenar energía solar. Cuando se necesita la energía el fotoisómero puede ser convertido de

¹⁰M. Blanco-Lomas, S. Samanta, P. J. Campos, G. A. Woolley, D. Sampedro, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 6960-6963.

¹¹ B. L. Feringa, N. P. M. Huck, H. A. van Doren, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 9929-9930.

nuevo al compuesto inicial eliminando el exceso de energía en forma de calor. Esto es conocido como “molecular solar thermal systems” (MOST).¹²

Se espera que los interruptores estudiados durante este trabajo tengan una función anticancerígena. Por ello, se llevará a cabo el estudio de interruptores derivados del metronidazol los cuales han demostrado ser fármacos anticancerígenos muy potentes *in vitro* e *in vivo*.^{13,14}

El metronidazol, el prototipo de nitroimidazol antimicrobiano, se introdujo originalmente para tratar *Trichomonas vaginalis*, pero ahora se usa para el tratamiento de infecciones anaeróbicas y protozoarias. Los nitroimidazoles son bactericidas de metabolitos tóxicos que causan la rotura de la cadena de ADN.¹⁵

Estudios realizados sobre derivados de la estructura del metronidazol han obtenido grandes resultados como agentes anticancerígenos. Estos derivados son modificados para mejorar las propiedades fotoquímicas y el fotocontrol estructural mediante la formación de un doble enlace (recuadro azul) que otorga el carácter de interruptor molecular al compuesto; a su vez la funcionalización del oxígeno (recuadro rojo) hace los compuestos citotóxicos en el rango micromolar frente a células cancerígenas humanas (A549 y HeLa) siendo testados mediante el IC₅₀. A su vez pueden ser controlados por radiación visible, son fotoquímica y térmicamente estables y solubles en agua.¹⁶

¹² A. Lennartson, A. Roffey, K. Moth-Poulsen, *Tetrahedron Lett.*, 56, **2015**, 1457-1465.

¹³ Y.-T. Duan, Y.-L. Sang, J. A. Makawana, S. B. Teraiya, Y.-F. Yao, D.-J. Tang, X.-X. Tao, H.-L. Zhu, *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, 85, 341-351.

¹⁴ Y.-L. Sang, Y.-T. Duan, H.-Y. Qiu, P.-F. Wang, J. A. Makawana, Z.-C. Wang, H.-L. Zhu, Z.-X. He, *RSC Advances*, **2014**, 4, 16694-16704.

¹⁵ C. D. Freeman, N. E. Klutman, K. C. Lamp, *Drugs*, **1997**, 54, 679-708.

¹⁶ D. Martínez-Lopez, C. García-Iriepa, S. Piñero-Hermida, I. P. Lopez, E. Alfaro-Arnedo, J. G. Pichel, P. J. Campos, D. Sampedro; Photocontrol of cytotoxic activity in metronidazole derivatives, pendiente de publicación.

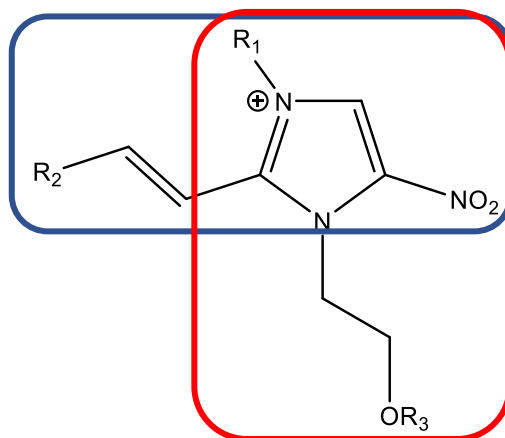


Fig. 8. Estructura del interruptor basado en el metronidazol.

Así pues, se llevará a cabo la síntesis de diversos interruptores modificando los reactivos de partida buscando una mayor conjugación y posterior funcionalización del nitrógeno y oxígeno pretendiendo controlar las propiedades fotoquímicas y la capacidad de afectar a la proliferación celular mediante un estímulo externo fácil de usar y no dañino.

4. Objetivos.

Los objetivos de este trabajo de fin de máster son:

- Sintetizar diferentes tipos de interruptores moleculares con potenciales efectos anticancerígenos basados en la estructura del antibiótico conocido como metronidazol.
- Una vez sintetizados, realizar un estudio de su comportamiento fotoquímico y evaluar sus características como interruptores moleculares.
- Finalmente, llevar a cabo ensayos biológicos para analizar su actividad anticancerígena.

5.Discusión de los resultados.

5.1 Preparación de derivados del metronidazol.

En primer lugar, se lleva a cabo la preparación de los diferentes compuestos derivados de metronidazol. Para ello se hace reaccionar el metronidazol con diferentes aldehídos seleccionados para tratar de aumentar la conjugación en los productos y desplazar así la absorción a la zona del visible con la ventaja de que esta radiación no es dañina para las células y aumentando a su vez la penetración en los tejidos biológicos.

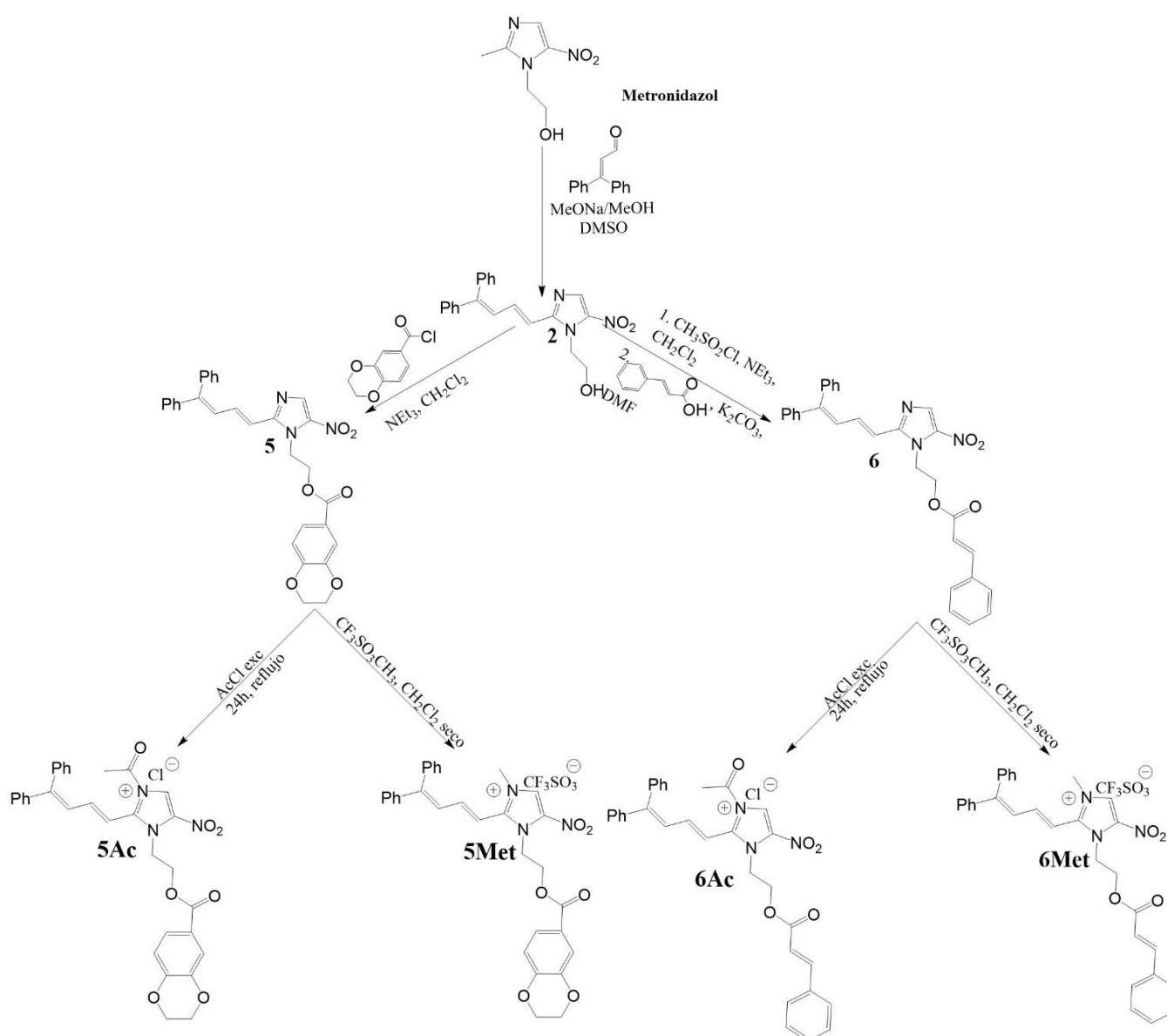
En este caso, se hace reaccionar al metronidazol con 2-metoxi-1-naftaldehído y 3,3-difenilacrilaldehído, a temperatura ambiente durante 24 h, obteniéndose así los compuestos **1** y **2**¹⁷. A partir de aquí la ruta puede seguir dos caminos distintos a la hora de funcionalizar el oxígeno. En un primer lugar se realizó la funcionalización del oxígeno con el ácido 2,3-dihidrobenczo[b][1,4]dioxano-6-carboxílico y posteriormente a la vista de los resultados de los ensayos biológicos se llevó a cabo otra funcionalización con el ácido cinámico. La funcionalización de los compuestos con los distintos ácidos pretende otorgar a los productos un carácter citotóxico, además también se puede variar los sustituyentes del anillo bencénico del ácido cinámico ya que estudios previos indican un aumento de la toxicidad de los compuestos neutros.¹⁸

Posteriormente, se procede a la acetilación y metilación de los compuestos ya funcionalizados en el oxígeno para promover así el carácter de interruptor molecular en los compuestos; que en este punto ya deberían poseer absorción en el rango del espectro visible y carácter citotóxico.

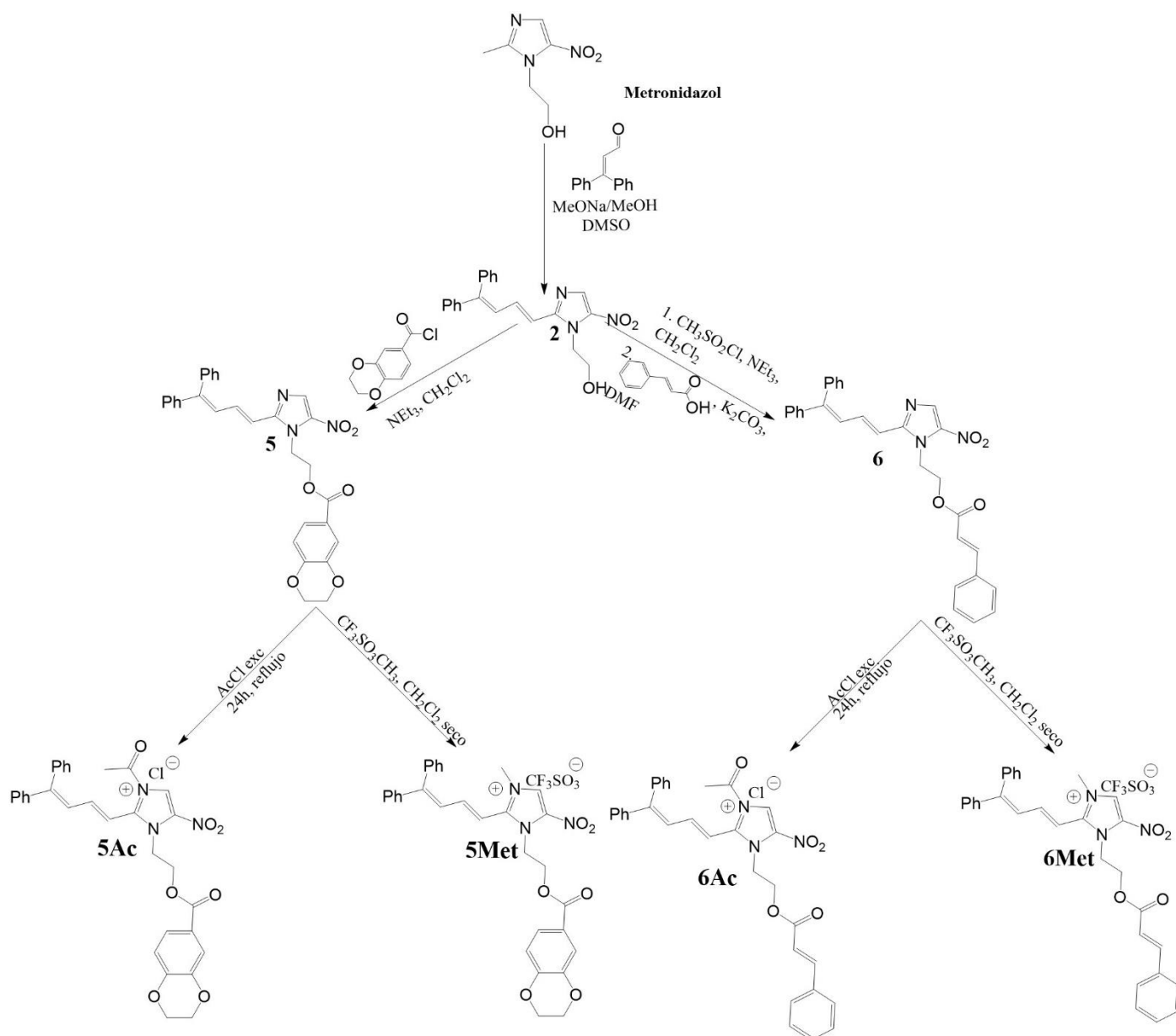
En todos estos compuestos se obtiene la configuración *E* ya que es la más estable termodinámicamente, además esto ha sido comprobado por RMN y comparada con los datos bibliográficos.¹⁷

¹⁷ Y. Sang, Y. Duan, H. Qiu, P. Wang, J. A. Makawana, Z. Wang, H. Zhu, Z. He, *RSC Adv.* **2014**, 4, 16694

¹⁸ Q. Yong, Z. Hong-Jia, Z. Hao, X. Chen, Z. Jing, Z. Hai-Liang, *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, **2010**, 4991-4996.



Esquema 1. Síntesis de derivados del metronidazol a partir del 2-metoxi-1-naftaldehído.



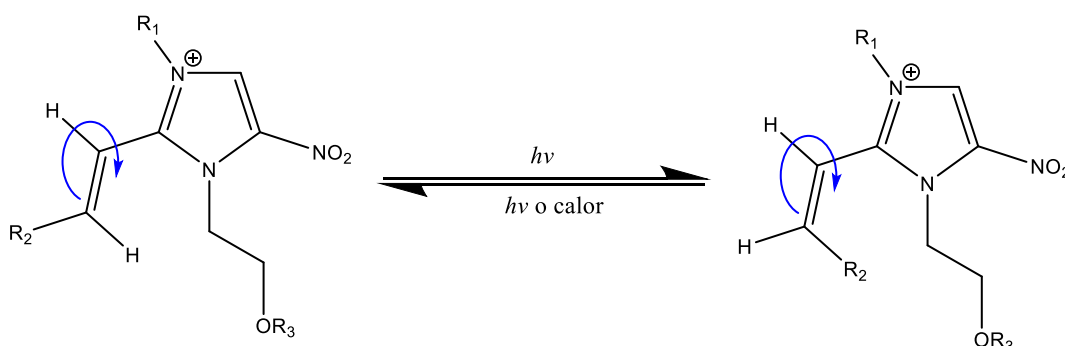
Esquema 2. Síntesis de derivados del metronidazol a partir del 3,3'-difenilacrilaldehído

De los 14 derivados propuestos se lograron sintetizar 10 de ellos ya que tras numerosos intentos no se pudo lograr la acetilación de los compuestos **3**, **4**, **5** y **6**. En cambio, la metilación de estos se dio satisfactoriamente procediendo así posteriormente a realizar el estudio fotoquímico y los ensayos biológicos con ellos.

5.2 Estudio fotoquímico de los interruptores moleculares.

Una vez realizada la síntesis de los interruptores moleculares se lleva a cabo el estudio de su comportamiento fotoquímico.

La aplicación de un estímulo externo, en este caso la irradiación con una fuente de luz LED, a un interruptor molecular permite el cambio entre dos estados distinto. En este tipo de compuestos los dos estados distintos son las configuraciones *Z/E* y el proceso fotoquímico es una fotoisomerización del enlace C=C obtenido de la reacción del metronidazol con diferentes aldehídos.

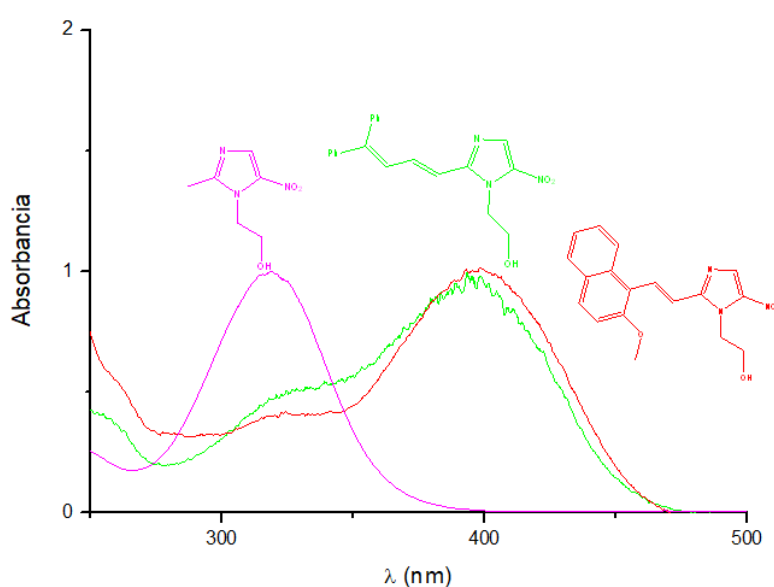


Esquema 3. Posible proceso de fotoisomerización.

Antes de comenzar a irradiar se hace el espectro UV-Vis de los diferentes derivados obteniéndose los valores de longitud de onda y coeficientes de extinción molar para la banda de máxima absorción que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1. Propiedades fotofísicas de los compuestos.

Compuesto	UV max (nm)	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)
1	397	10200
2	394	20920
3	419	16180
3Met	408	5240
4	414	14514
4Met	408	8890
5	409	20900
5Met	384	18172
6	410	5760
6Met	380	17600

**Fig. 9.** Espectros de UV-Vis del metronidazol (rosa), compuestos **1** (rojo) y **2** (verde).

Como se observa en la figura 9 el metronidazol tiene un máximo de absorción en 318 nm y la posterior adición de los aldehídos desplaza el máximo de absorción hacia la zona de 400 nm, habiéndose así cumplido el primer objetivo; conseguir que los compuestos absorban en la zona del visible con la ventaja de que esta radiación no es dañina para las células.

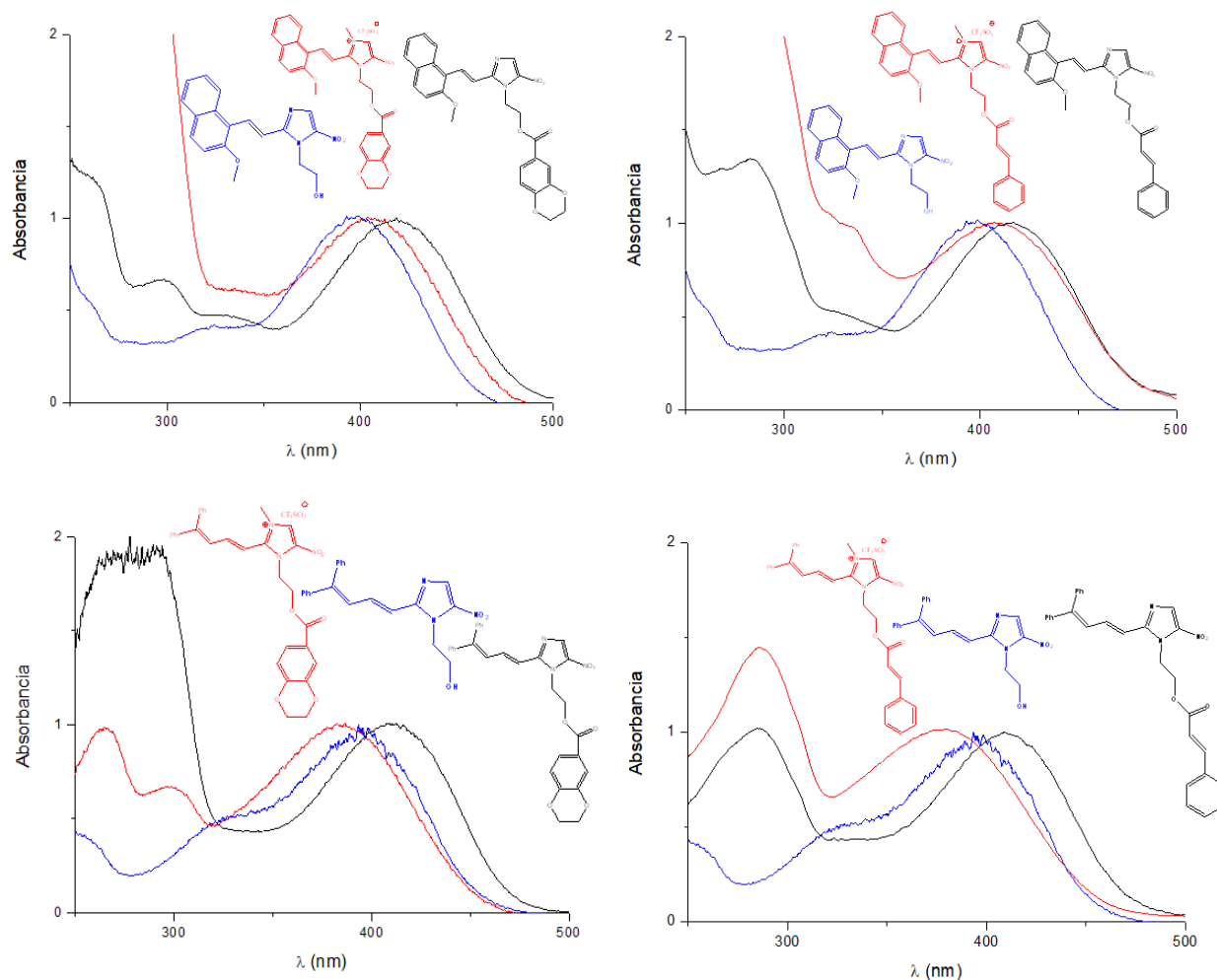


Fig. 10. Espectros de UV-Vis de los compuestos estudiados (compuestos no metilados ni funcionalizados en azul, compuestos funcionalizados en negro y compuestos funcionalizados y metilados en rojo).

A su vez, la funcionalización del oxígeno en los compuestos también produce un desplazamiento batocrómico en el máximo de absorción de hasta 10 nm en todos los casos (Compuestos **3**, **4**, **5**, y **6**).

En la familia de derivados provenientes del 2-metoxi-1-naftaldehído se observa que, utilizando ambas vías de funcionalización del oxígeno y una posterior metilación del nitrógeno, los compuestos sufren un desplazamiento hipsocrómico en el máximo de absorción en comparación con los compuestos no metilados, pero un efecto batocrómico en comparación con los compuestos no funcionalizados.

En cambio, en la familia de compuestos proveniente del 3,3-difenilacrilaldehído se observa que, utilizando ambas vías de funcionalización del oxígeno y una posterior metilación del nitrógeno, los compuestos sufren un efecto hipsocrómico en el máximo de absorción con respecto a los compuestos no funcionalizados y funcionalizados en el oxígeno; teniendo una diferencia de hasta 10 nm con los compuestos no funcionalizados.

Tras obtener el espectro UV-Vis se procede a la irradiación de los compuestos en LED blanco (Ver figura 19), para irradiar así en la cola de la banda que está situada en la zona visible. La irradiación de los compuestos se realiza en tubos de RMN de Pyrex utilizando como disolvente $d\text{-CDCl}_3$ pudiendo así seguir la reacción de fotoisomerización a diferentes intervalos de tiempo y pudiendo finalmente obtener la proporción de los isómeros *Z/E* en cada medida.

Así pues, se procedió a la irradiación de los diferentes derivados realizando ^1H RMN en intervalos de 10 minutos y realizando las correspondientes integraciones para obtener en cada caso la proporción de isómeros, así como el punto final donde se llega al estado fotoestacionario, cuando la proporción de isómeros *Z/E* no varía.

Tabla 2. Proporción de isómeros *Z/E* en los derivados del metronidazol.

Compuesto	Estado fotoestacionario (<i>Z:E</i>)
1	0:100
2	0:100
3	0:100
3Met	78:22
4	0:100
4Met	70:30
5	0:100
5Met	82:18
6	0:100
6Met	80:20

Al irradiar los compuestos neutros largos periodos de tiempo no se observa isomerización en ellos, siendo directamente fotoestables.

Los compuestos metilados sometidos a cortos intervalos de tiempo (menos de 30 minutos) proporcionan resultados muy satisfactorios al presentar una proporción en el estado fotoestacionario de un 82:18 en el mejor de los casos.

5.3. Estudio computacional

Se llevaron a cabo una serie de estudios computacionales sobre distintos derivados del metronidazol con la intención de analizar el efecto de distintos sustituyentes en el desplazamiento del espectro de absorción hacia el rojo. En este caso nos centramos en la modificación del sustituyente R_1 , introduciendo grupos dadores (metilo y fenilo) o aceptores (acetilo).

Para ello, se optimizaron estos tres compuestos en el estado fundamental a nivel DFT con el funcional CAM-B3LYP y la base 6-31+g** (Figura 11). Posteriormente, las energías de excitación fueron calculadas con TD-DFT utilizando el mismo funcional y base. Estos cálculos se realizaron en fase gas, utilizando el programa Gaussian 09.

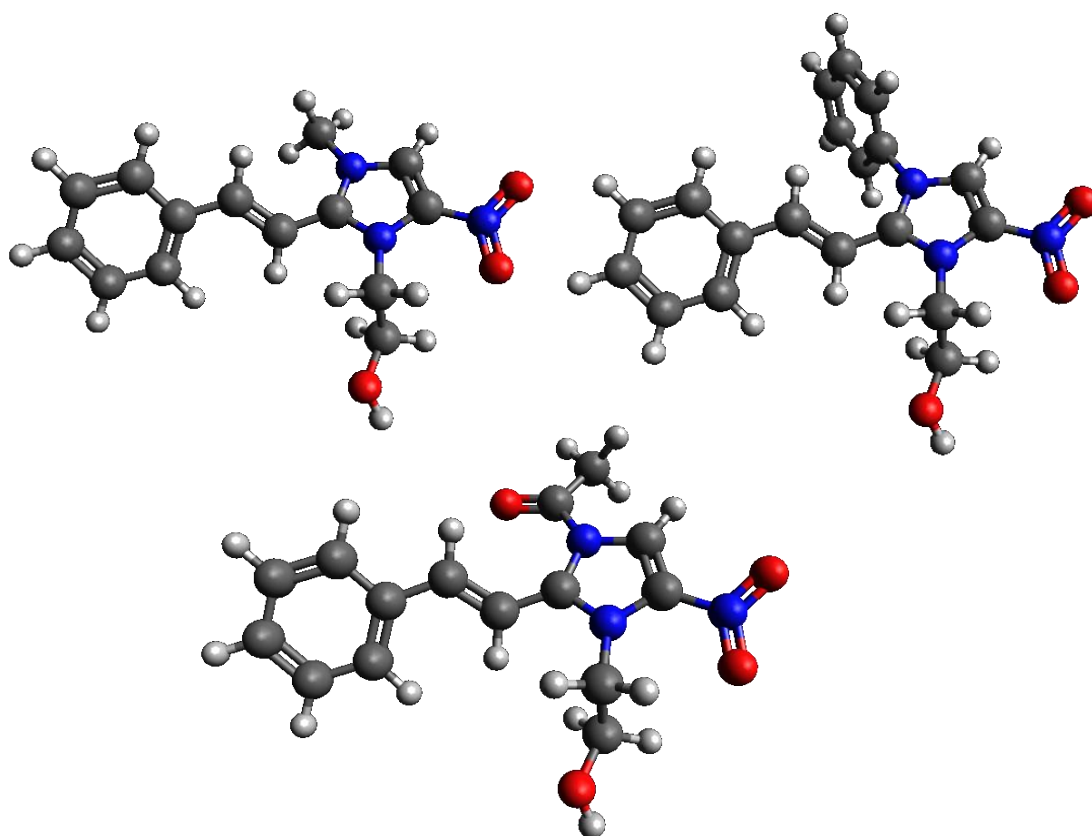


Fig. 11. Estructuras optimizadas de los diferentes derivados de metronidazol con R_1 = metilo, fenilo o acilo.

Los resultados obtenidos para los tres derivados estudiados quedan recogidos en la tabla 3. Para los tres compuestos, el primer estado excitado singlete es ópticamente brillante. Como se puede observar, la acilación de los compuestos propiciaba un desplazamiento del espectro de absorción hacia el rojo de hasta 30 nm más que los compuestos metilados, razón por la cual se intentó llevar a cabo este paso a la hora de sintetizar nuevos derivados.

Tabla 3. Derivados con distintos grupos R₁.

R ₁	λ (nm)
Metilo	321
Fenilo	330
Acetilo	352

Para intentar comprender por qué el hecho de introducir un grupo atractor de electrones como es el acetilo produce un desplazamiento de la longitud de onda hacia el rojo con respecto al metilo, se llevó a cabo el análisis de la naturaleza del estado excitado brillante y los orbitales moleculares involucrados.

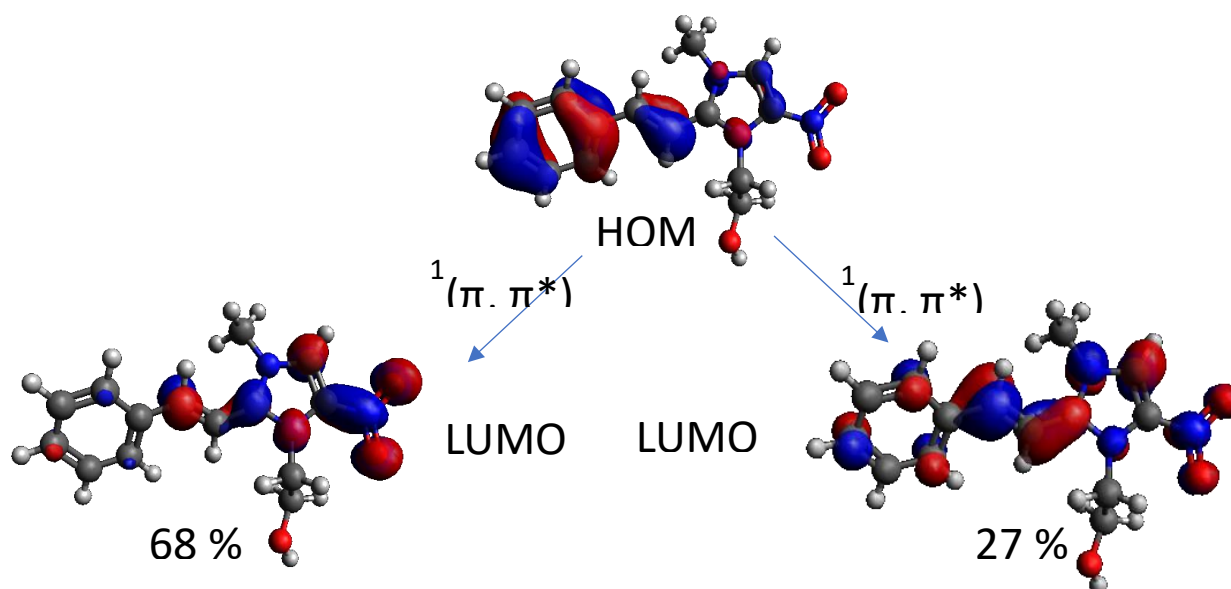


Fig. 12. Resultados obtenidos para los derivados de metronidazol metilado.

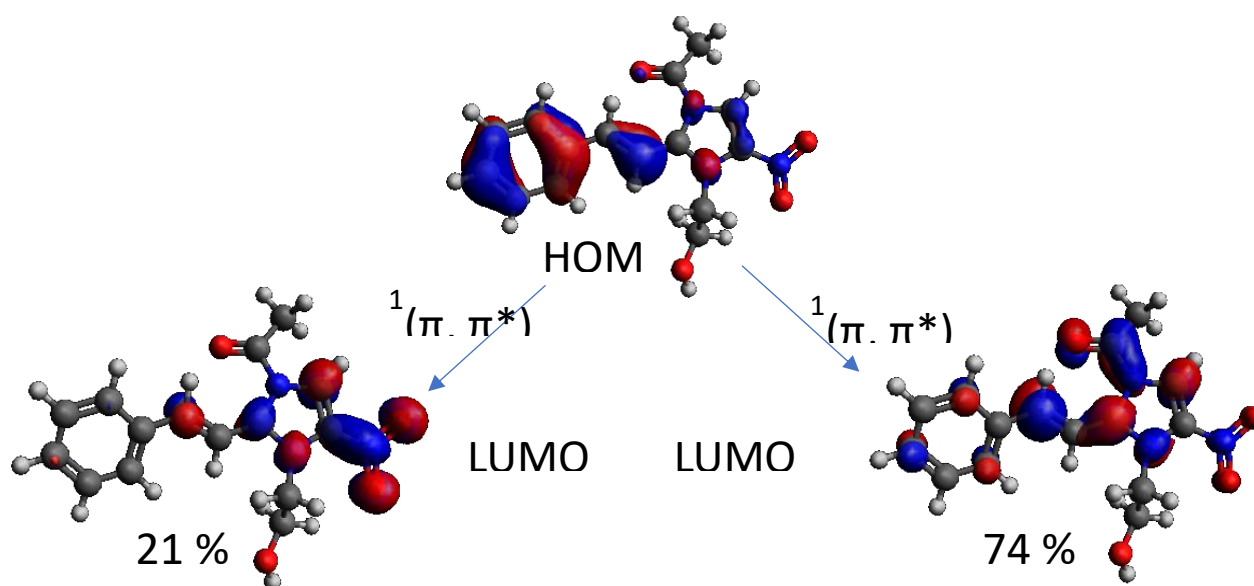


Fig. 13. Resultados obtenidos para los derivados de metronidazol acilado.

Para el derivado con el grupo metilo, la naturaleza del estado excitado puede describirse por una combinación de dos transiciones monoeléctricas π , π^* : un 68% HOMO \rightarrow LUMO y un 27 % HOMO \rightarrow LUMO +1. En cambio, para el derivado acilado, los pesos de estas configuraciones electrónicas se revierten, estando el estado excitado descrito por un 74 % HOMO \rightarrow LUMO +1 y un 21 % HOMO \rightarrow LUMO. Este hecho podría explicar que el estado excitado del derivado acilado sea más estable y por ello posea una longitud de onda de absorción más al rojo. Para entender el cambio en la naturaleza del estado excitado del derivado acetilado, hemos comparado los orbitales moleculares HOMO, LUMO y LUMO +1 para el compuesto metilado y acilado. Como se observa en ambos casos el orbital HOMO es prácticamente igual, toda la densidad electrónica se encuentra en el fenilo y en el doble enlace. Igualmente, el orbital LUMO es similar con la densidad electrónica centrada en el anillo de metronidazol y en el grupo aceptor NO_2 . Así, se observa una clara transferencia de carga del fenilo al anillo de metronidazol tras la excitación. En cambio, hay una clara diferencia en el orbital LUMO +1: mientras que para el derivado con metilo la densidad electrónica se localiza en el centro de la molécula, para el derivado acilado es este nuevo grupo aceptor que localiza parte de la densidad electrónica.

5.4 Ensayos biológicos de los interruptores moleculares.

Los ensayos biológicos se realizaron en el Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR) con células de HeLa y A549 las cuales han crecido en un medio RPMI 1640 suplementado al 10% y 5% respectivamente de FBS y al 1% de antibióticos.

Se pretendía evaluar el rango de concentraciones de 200 μM a 0,78 μM de los compuestos **3Met** y **5Met**, sobre una concentración de 1500 céls/pocillo mediante el ensayo MTT.

A continuación, se exponen los resultados visuales que se obtuvieron en el ensayo MTT el cual se encuentra explicado en la parte experimental. Como se observa a primera vista todos los pocillos resultaron tener una coloración marrón lo que conlleva a una alta actividad metabólica en el pocillo, es decir, hay un gran número de células vivas en el pocillo. El color amarillo que cabría esperar indicaría una baja actividad metabólica con la consecuente muerte de las células.

Se puede concluir con este ensayo que a pesar de que bajo microscopio sí que se observaban células muertas la concentración de estas no es apreciable por el ensayo de MTT, por lo que los compuestos no son los suficientemente tóxicos para estas.

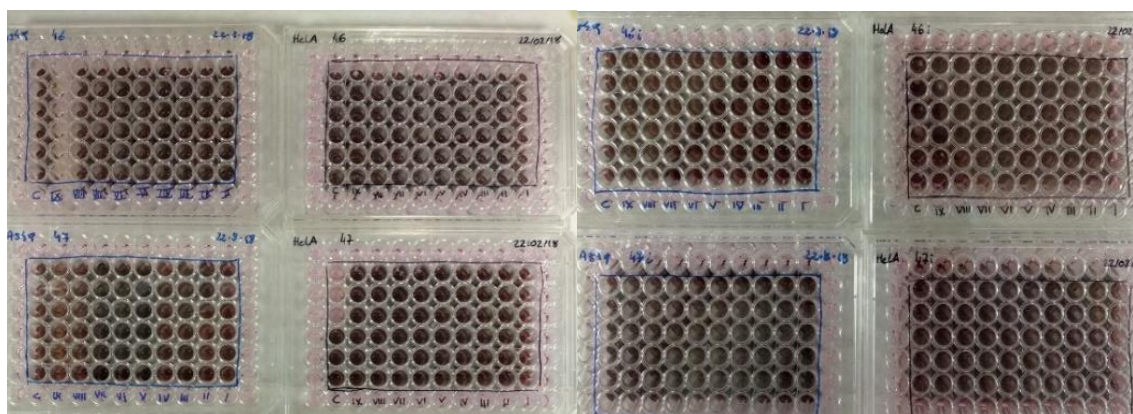


Fig. 14. Resultado visual del ensayo MTT.

A partir de los datos de absorbancia a 490 nm se pudieron realizar las siguientes gráficas donde se observa de una forma más clara la no toxicidad de estos compuestos.

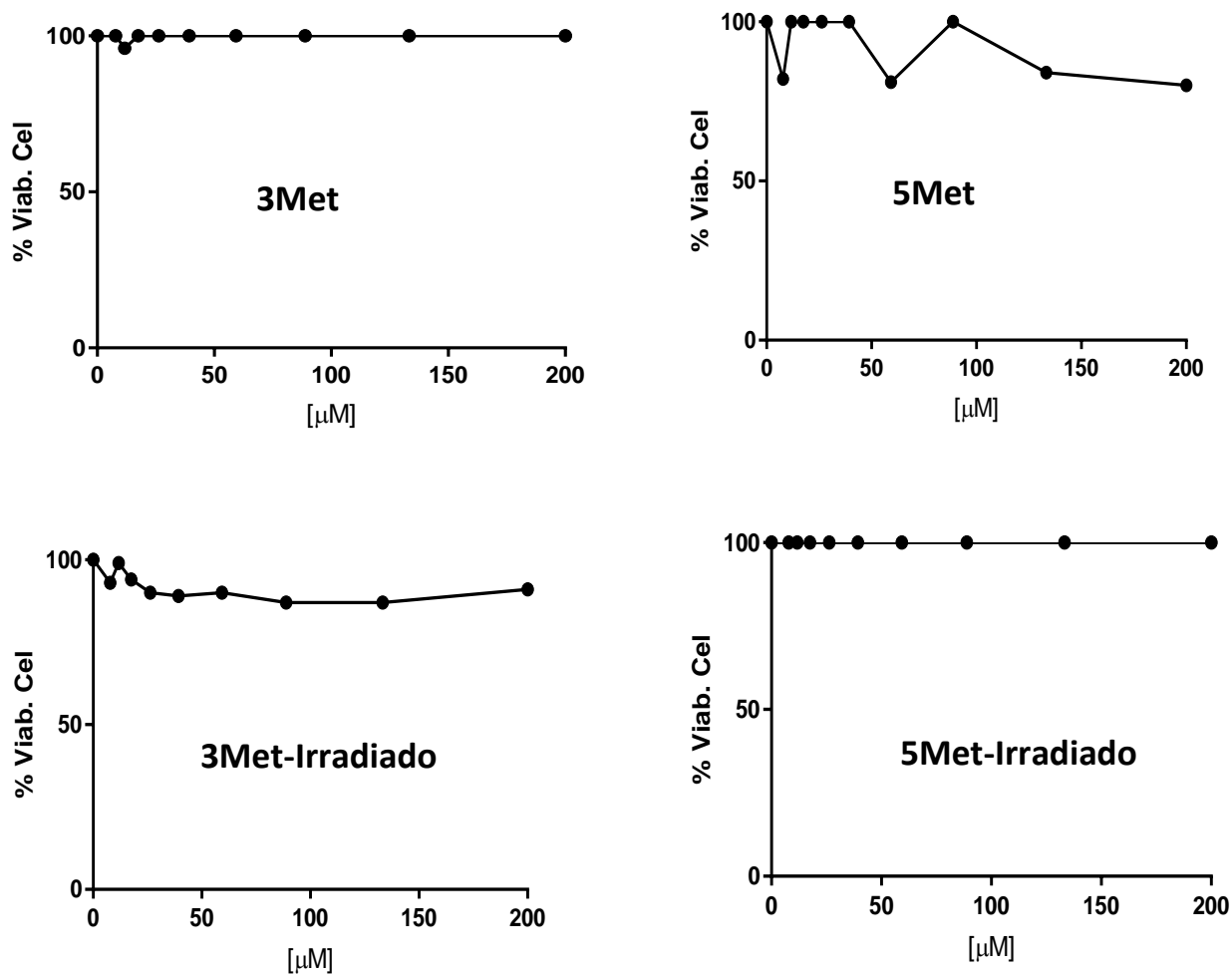


Fig. 15. Representación gráfica de los resultados de absorbancia a 490nm obtenidos para la línea celular A549.

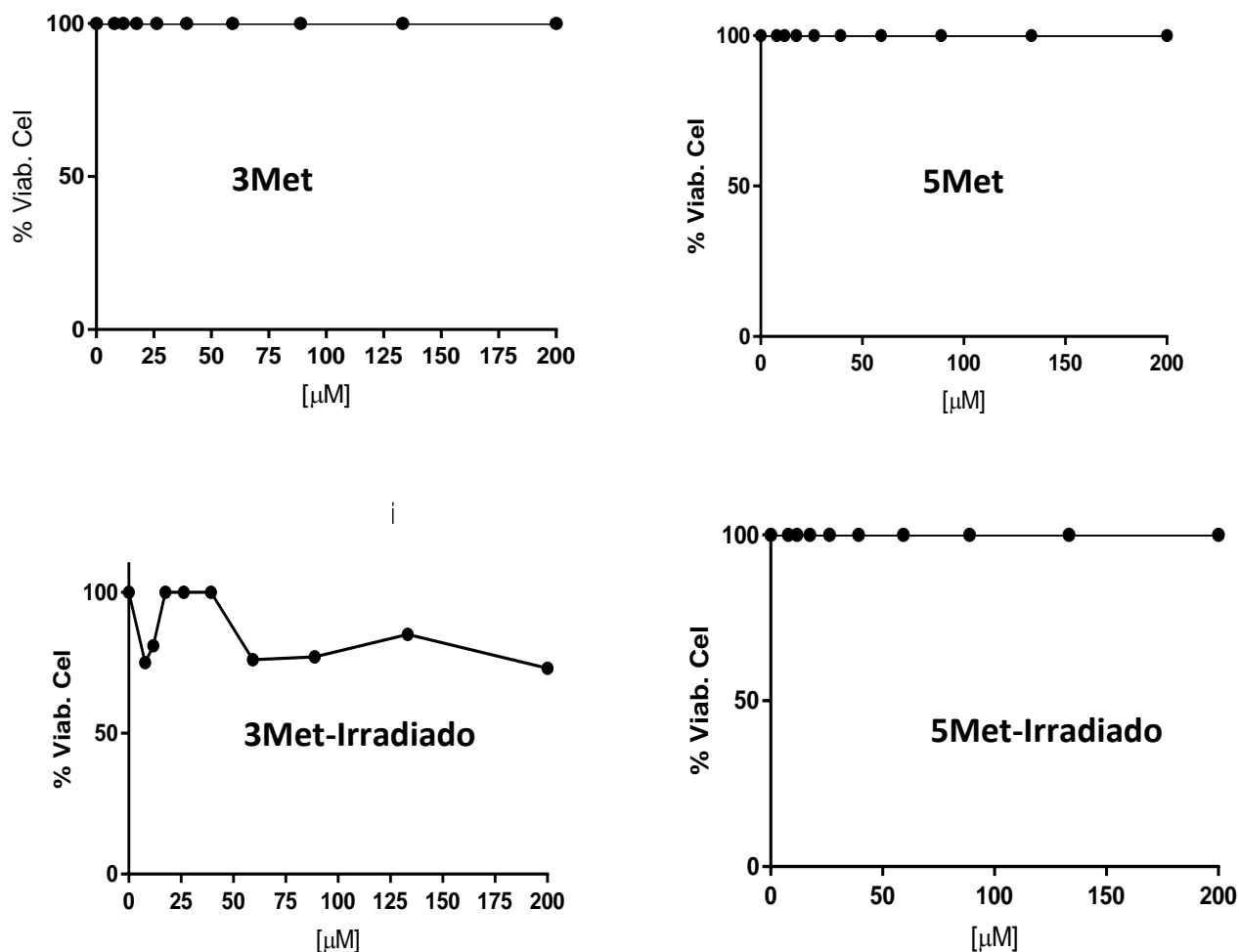


Fig. 16. Representación gráfica de los resultados de absorbancia a 490nm obtenidos para la línea celular HeLA.

A pesar de que los compuestos estudiados en estos ensayos resultaron no ser citotóxicos se procedió a la síntesis de una nueva línea de derivados del metronidazol con la funcionalización del oxígeno con el ácido cinámico, como ya se ha explicado anteriormente.

Así pues, los resultados obtenidos de estos nuevos compuestos se recogen a continuación.

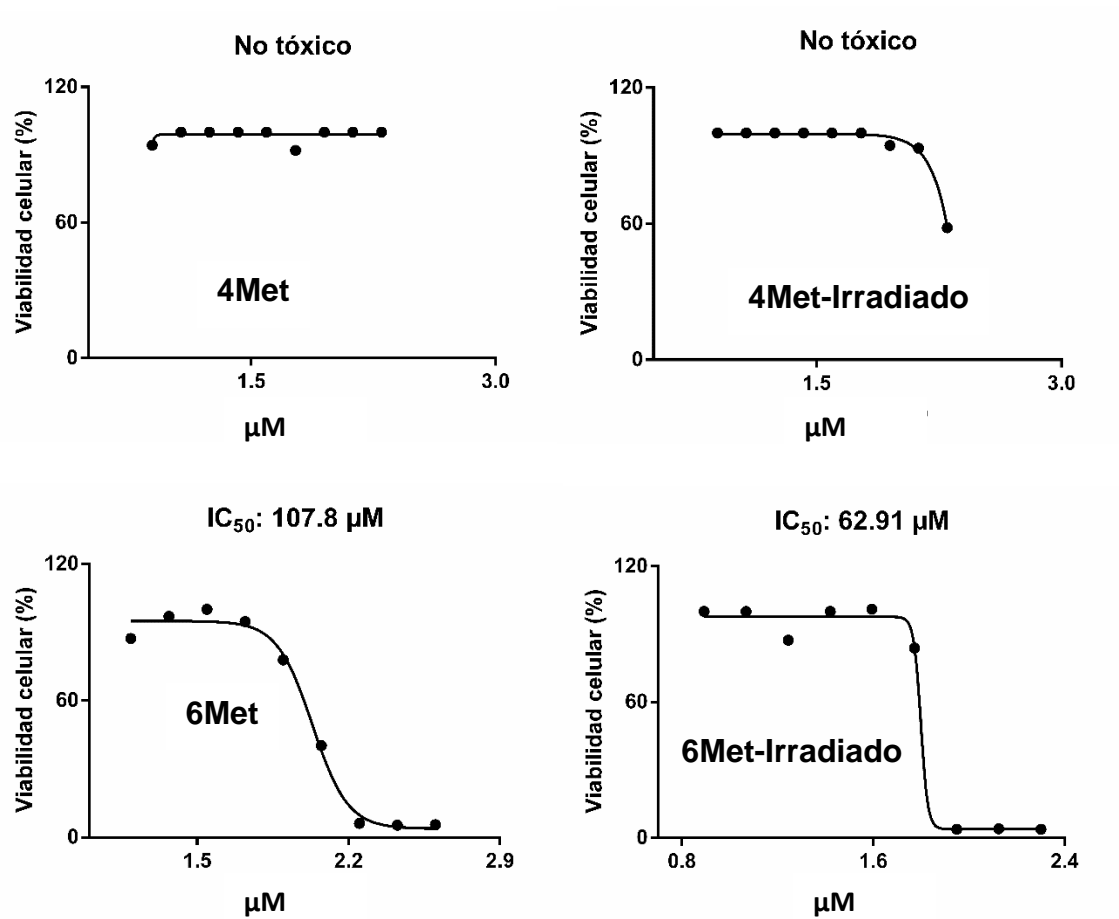


Fig. 17. Representación gráfica de los resultados de absorbancia a 490 nm obtenidos para la línea celular A549.

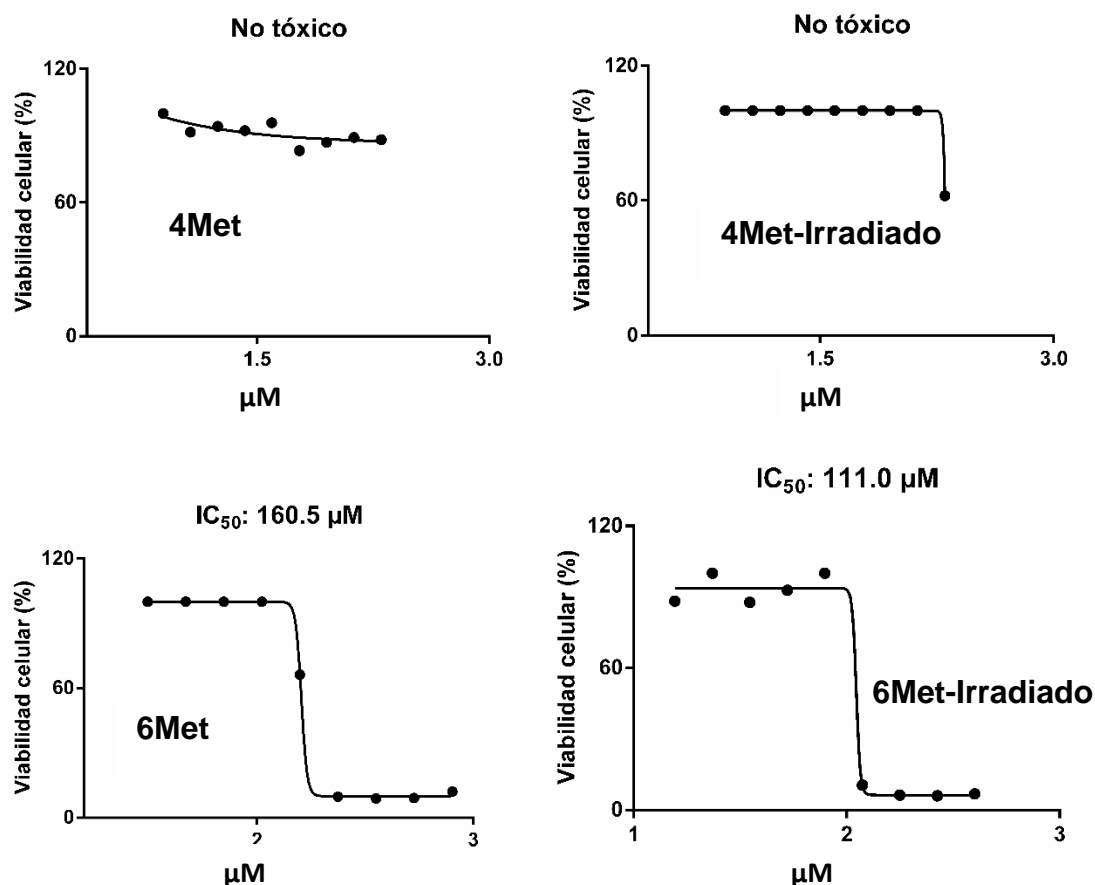


Fig. 18. Representación gráfica de los resultados de absorbancia a 490 nm obtenidos para la línea celular HeLa.

Como se observa en ambas líneas celulares el compuesto **4Met** resulta ser no citotóxico mientras que el compuesto **6Met** si lo es, teniendo en el mejor de los casos un IC₅₀ de 62.91 μM sobre la línea celular A549.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que el compuesto **6Met** posee capacidad citotóxica y esta podría ser controlada mediante el estímulo de la luz. Actualmente, aún se están llevando a cabo réplicas de los ensayos con este compuesto para concretar aún más el IC₅₀.

6.Conclusiones.

A partir del estudio que se ha realizado en este trabajo se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- Se ha logrado sintetizar interruptores moleculares basados en la estructura del metronidazol de forma sencilla y eficaz.
- Se ha logrado desplazar el máximo de absorción de estos a mayores longitudes de onda donde la radiación es menos dañina para las células.
- Los compuestos neutros no poseen el comportamiento de interruptor molecular, pero en cambio, al funcionalizar el nitrógeno si se obtiene ese comportamiento en los compuestos **3**, **4**, **5** y **6**.
- Son los compuestos **3Met** y **5Met** los que mayor desplazamiento en el máximo de absorción tienen, pero poseen mejores resultados en el proceso de fotoisomerización los compuestos **4Met** y **6Met**.
- Desafortunadamente los compuestos **3Met** y **5Met** no poseen carácter citotóxico, pero por ello se llevó a cabo la síntesis de otros derivados (**4Met** y **6Met**) con la intención de mejorar esas propiedades. Satisfactoriamente el compuesto **6Met** resultó poseer un IC₅₀ de 62.91 µM sobre la línea celular A549.

7.Experimental.

7.1. Consideraciones generales.

- **Resonancia magnética nuclear.**

Los experimentos de resonancia magnética nuclear ^1H y ^{13}C se ha llevado a cabo en un equipo Bruker-ARX-300 y/o Bruker Avance 400. Como disolvente se ha utilizado d-CDCl_3 . Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento de hercios (Hz). Las multiplicidades de las señales se indican de la siguiente forma: (s) = singlete, (d) = doblete, (t) = triplete, (c) = cuatriplete, (m) = multiplete.

- **Espectroscopía ultravioleta-visible.**

Los espectros de absorción molecular se obtuvieron mediante un espectrofotómetro de fila de diodos modelo HP 8451 A. Se emplearon disoluciones de concentración 5×10^{-5} M en cubetas de cuarzo de 1cm de paso óptico y metanol como disolvente.

- **Espectrometría de masas.**

El UPLC-MS se realizó con un equipo microTOF-Q de Bruker provisto de una fuente de ionización electrospray, con una columna ACQUALITY UPLC de Waters.

- **Cromatografía.**

Las cromatografías de capa fina se han llevado a cabo utilizando cromatofolios de gel de sílice de 0.2 mm de espesor, con indicador UV (F_{254}).

Las cromatografías de columna se han realizado con una fase estacionaria de gel de sílice y como fase móvil los eluyentes especificados en cada caso.

- **Lámparas e instrumentación fotoquímica.**

Las irradiaciones se han realizado en SMS LED FLOODLIGHT 0001101, MODEL N.: VT-4751, Watts: 50W, COLOR: White 6000K, cuya irradiancia a 4 cm de distancia es:

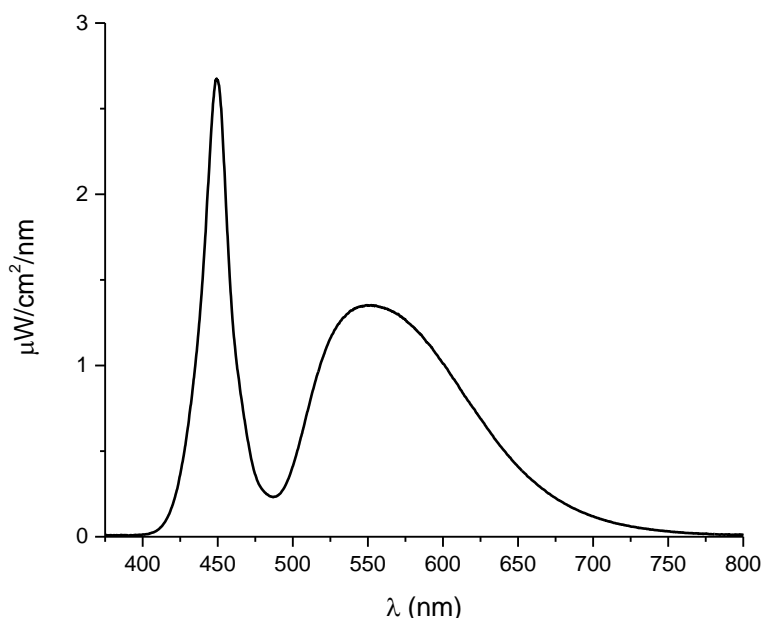
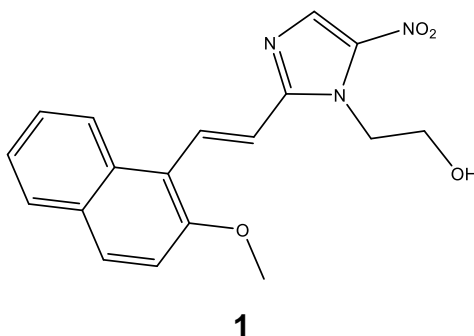


Fig. 19. Espectro de emisión del LED.

7.2. Síntesis de interruptores moleculares basados en metronidazol.

7.2.1 Síntesis

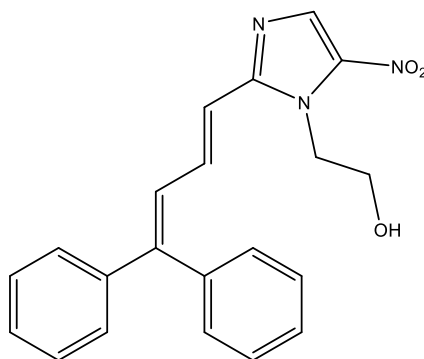
(*E*)-2-(2-(2-(2-metoxinaftalen-1-il)vinil)-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etan-1-ol



Se disuelve el metronidazol (855.8 mg, 5 mmoles) junto con 2-metoxi-1-naftaldehído (931.05 mg, 5 mmoles) en DMSO (10 mL). Se añade lentamente a esta mezcla en agitación otra disolución de MeONa (240.39 mg, 4.45 mmoles) en MeOH (2 mL) con ayuda de una pipeta Pasteur, observándose un cambio en la

coloración. Se deja la mezcla en agitación durante un día a temperatura ambiente siguiendo la reacción por cromatografía de capa fina. Una vez transcurrido este tiempo, se añaden 20 mL de agua, la suspensión obtenida se filtra obteniendo un sólido naranja, que se purifica mediante una recrystalización con etanol, acetona y éter (2:1:5) y se lava con agua fría (3x25 mL) secándose finalmente para obtener el producto sólido puro, **1** (294 mg, 0,867 mmoles, 17%)

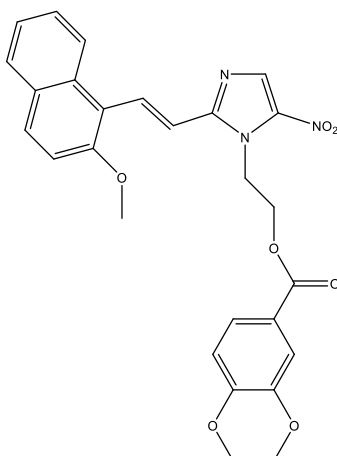
(E)-2-(2-(4,4-difenilbuta-1,3-dien-1-il)-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etan-1-ol



2

Se disuelve el metronidazol (207.11 mg, 1.2 mmoles) junto con 3,3-difenilacrilaldehído (252.00 mg, 1.2 mmoles) en DMSO (10 mL). Se añaden lentamente a esta mezcla en agitación otra disolución de MeONa (24.39mg, 0.45mmoles) en MeOH (1mL) con ayuda de una pipeta Pasteur, observándose un cambio en la coloración. Se deja la mezcla en agitación durante un día a temperatura ambiente siguiendo la reacción por cromatografía de capa fina. Una vez transcurrido este tiempo, se añaden 10 mL de agua y se filtra en un Kitasato. El sólido obtenido se purifica mediante una recrystalización con etanol, acetona y éter (2:1:5) y se lava con agua fría (3x25 mL) secándose finalmente para obtener el producto sólido puro, **2** (239.1 mg, 0,662 mmoles, 55%).

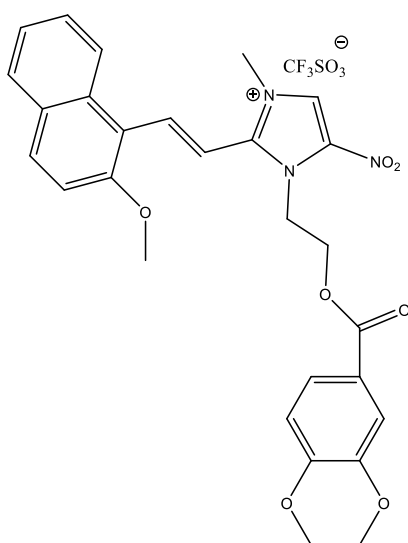
(E)-2-(2-(2-(2-metoxinaftalen-1-il)vinil)-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil 2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-6-carboxilato



3

El compuesto **1** (169.56 mg, 0.5 mmoles) se disuelve en CH_2Cl_2 seco, junto con el cloruro de 2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxen-6-carbonil (99.300 mg, 0,5 mmoles) y se añade gota a gota NEt_3 (0,28 mL). La reacción se deja bajo agitación y temperatura ambiente durante 24 h. Se sigue su evolución por cromatografía de capa fina. Una vez transcurrido este tiempo, se elimina el disolvente y se purifica mediante cromatografía de columna Hexano: Acetato de etilo (1:1), obteniéndose el compuesto **3**. (198.50 mg, 0.39 mmoles, 78%)

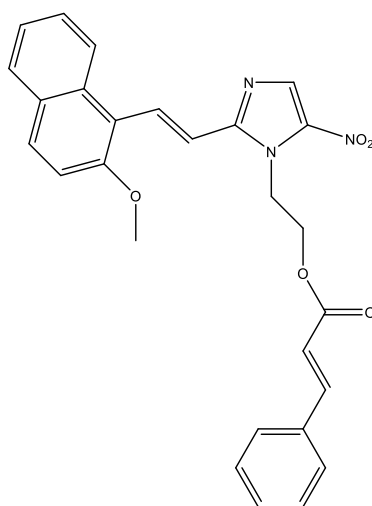
(E/Z)-1-(-(2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxen-6-carbonil)oxi)etil)-2-(2-(2-metoxinaftalen-1-il)vinil)-3-metil-5-nitro-1H-imidazol-3-io trifluorometanosulfonato



3Met

El compuesto **3** (184.90 mg, 0.37 mmoles) se disuelve en CH_2Cl_2 seco y se añade gota a gota $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$ (40.30 μL). La reacción se deja bajo agitación y temperatura ambiente durante 24 h. Se sigue su evolución por cromatografía de capa fina. Una vez transcurrido este tiempo, se elimina el disolvente. (150.76mg, 0.29 mmoles, 78%).

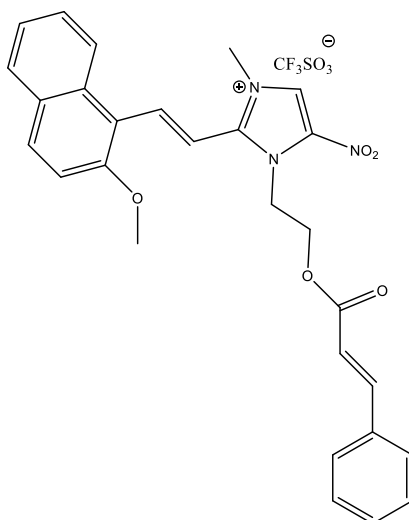
2-(2-((E)-2-(2-metoxinaftalen-1-il)vinil)-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil cinamato



4

El compuesto **1** (76.50 mg, 0.22 mmoles) se disuelve en CH_2Cl_2 , junto con el cloruro de metanosulfonilo (25.84 mg, 0,22 mmoles) y se añade gota a gota NEt_3 (0,125 mL). La reacción se deja bajo agitación y en un baño de hielo durante 5h. Se sigue su evolución por cromatografía de capa fina. Una vez transcurrido este tiempo, se elimina el disolvente obteniendo un compuesto intermedio que se hace reaccionar con el ácido cinámico (43.69 mg, 0.29 mmoles) junto con K_2CO_3 (81.51 mg, 0.58 mmoles) disuelto en DMF y se deja reaccionar bajo agitación y a una temperatura de 80°C durante 24h. (27.65 mg, 0.06mmoles, 27%)

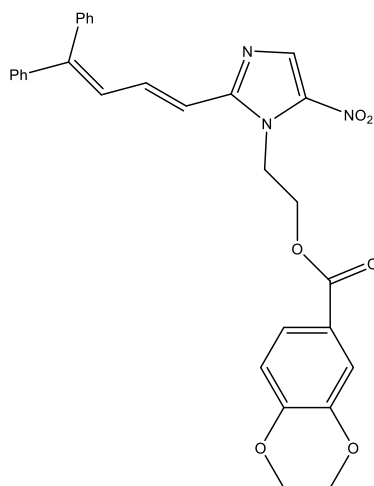
(E/Z) 1-(2-(cinamoxy)etil)-2-((E)-2-(2-metoxinaftalen-1-il)vinil)-3-metil-5-nitro-1H-imidazol-3-io trifuolmetanosulfonato



4Met

El compuesto **4** (16.70 mg, 0.03 mmoles) se disuelve en CH₂Cl₂ seco y se añade gota a gota CF₃SO₃CH₃ (15.60 µL). La reacción se deja bajo agitación y temperatura ambiente durante 24 h. Se sigue su evolución por cromatografía de capa fina. Una vez transcurrido este tiempo, se elimina el disolvente. (10.56 mg, 0.02 mmoles, 73%) .

(E)-2-(2-(4,4-difenilbuta-1,3-dien-1-il)-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil 2,3-dihidrobenczo[b][1,4]dioxen-6-carboxilato

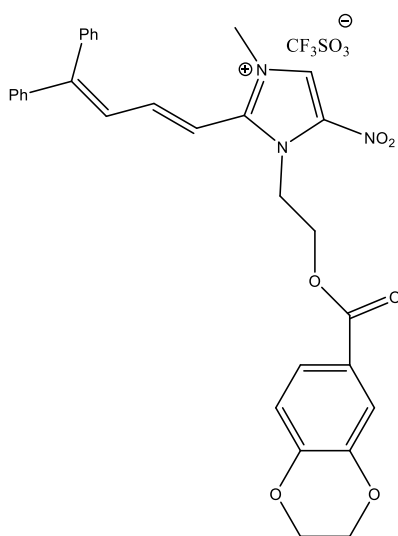


5

El compuesto **2** (68.00 mg, 0.2 mmoles) se disuelve en CH₂Cl₂ seco, junto con el cloruro de 2,3-dihidrobenczo[b][1,4]dioxen-6-carbonil (40.00 mg, 0,2 mmoles) y se añade gota a gota NEt₃ (0,1 mL). La reacción se deja bajo agitación y

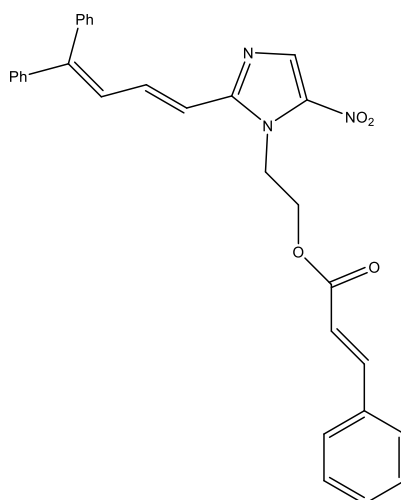
temperatura ambiente durante 24 h. Se sigue su evolución por cromatografía de capa fina. Una vez transcurrido este tiempo, se elimina el disolvente y se purifica mediante cromatografía de columna Hexano: Acetato de etilo (1:1), obteniéndose el compuesto **5**. (65.00mg, 0.12 mmoles, 60%)

(E/Z)-1-(2—((2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxen-6-carbonil)oxi)etil)-2-(4,4-difenilbuta-1,3-dien-1-il)-3-metil-5-nitro-1H-imidazol-3-io trifluorometanosulfonato

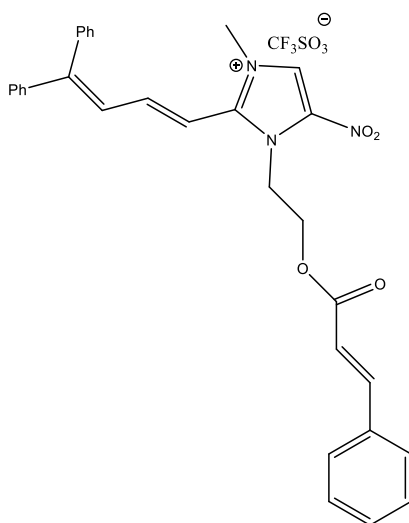


5Met

El compuesto **5** (40.70 mg, 0.07 mmoles) se disuelve en CH₂Cl₂ seco y se añade gota a gota CF₃SO₃CH₃ (8.50 µL). La reacción se deja bajo agitación y temperatura ambiente durante 24 h. Se sigue su evolución por cromatografía de capa fina. Una vez transcurrido este tiempo, se elimina el disolvente. (39.50mg, 0.07 mmoles, 98%) .

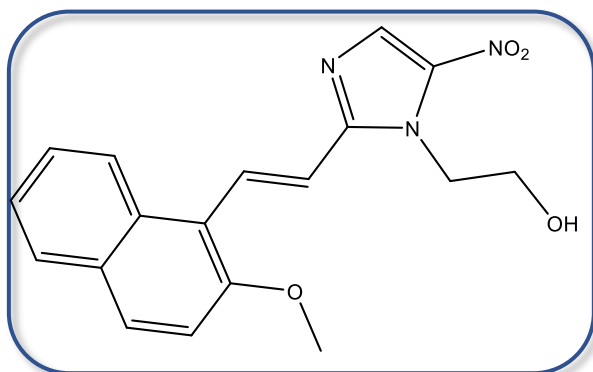
2-(2-((E)-4,4-difenilbuta-1,3-dien-1-il)-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil cinamato**6**

El compuesto **2** (109.10 mg, 0.30 mmoles) se disuelve en CH_2Cl_2 , junto con el cloruro de metanosulfonilo (34.60 mg, 0,30 mmoles) y se añade gota a gota NEt_3 (0,168 mL). La reacción se deja bajo agitación y en un baño de hielo durante 5h. Se sigue su evolución por cromatografía de capa fina. Una vez transcurrido este tiempo, se elimina el disolvente obteniendo un compuesto intermedio que se hace reaccionar con el ácido cinámico (37.68 mg, 0.25 mmoles) junto con K_2CO_3 (70.31 mg, 0.50 mmoles) disuelto en DMF y se deja reaccionar bajo agitación y a una temperatura de 80°C durante 24h. (30.86 mg, 0.06 mmoles, 21%)

(E/Z) 1-(2-(cinamoxi)wtil)-2-((E)-4,4-difenilbutan-1,3-dien-1-il)-3-metil-5-nitro-1H-imidazol-3-io trifluorometanosulfonato**6Met**

El compuesto **6** (20.80 mg, 0.04 mmoles) se disuelve en CH₂Cl₂ seco y se añade gota a gota CF₃SO₃CH₃ (4.60 µL). La reacción se deja bajo agitación y temperatura ambiente durante 24 h. Se sigue su evolución por cromatografía de capa fina. Una vez transcurrido este tiempo, se elimina el disolvente. (16.78 mg, 0.03 mmoles, 83%).

7.2.2. Caracterización de los interruptores moleculares.



• *Compuesto 1.*

Fórmula molecular:

C₁₈H₁₇N₃O₄

Peso molecular: 339.35
g/mol

Rendimiento: 17%

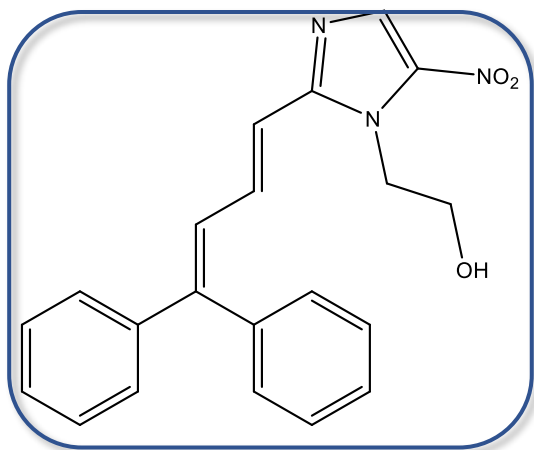
¹H RMN (300 MHz, Metanol-*d*₄) δ 8.47 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 8.32 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.95 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.86 (dd, *J* = 8.0, 1.3 Hz, 1H), 7.63 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.56 (td, 1H), 7.49 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.42 (td, 1H), 4.68 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 4.10 (s, 3H), 3.95 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H).

¹³C RMN (75 MHz, Metanol-*d*₄) δ 158.1, 153.1, 134.5, 134.1, 133.1, 132.3, 129.7, 128.4, 124.8, 124.1, 118.9, 118.5, 114.1.

UV-Vis (MeOH): λ (nm) = 339 (ε=9866 M⁻¹cm⁻¹)

ES-MS (+) (C₁₈H₁₇N₃O₄ +H): 340.1294

Observaciones: Sólido naranja.



• *Compuesto 2.*

Fórmula molecular:

C₂₁H₁₉N₃O₃

Peso molecular: 361.14
g/mol

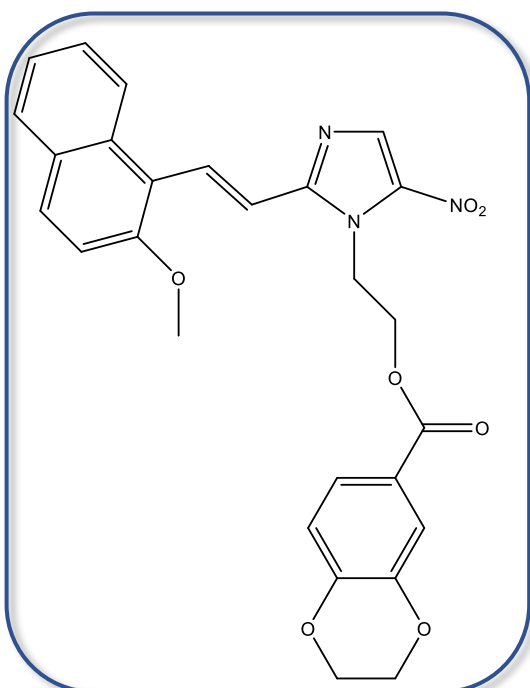
Rendimiento: 55%

^1H RMN (300 MHz, Metanol- d_4) δ 7.97 (d, $J = 0.4$ Hz, 1H), 7.54 (s, 0H), 7.49 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 7.47 – 7.41 (m, 5H), 7.32 (s, 6H), 7.24 (dd, 2H), 7.06 (dd, $J = 11.5, 0.7$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H), 4.61 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 3.86 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H).

^{13}C RMN (75 MHz, Metanol- d_4) δ 152.1, 149.9, 142.9, 140.4, 138.0, 134.7, 131.6, 129.6, 129.5, 129.5, 129.23, 129.0, 127.8, 118.4, 61.7.

UV-Vis (MeOH): λ (nm) = 393 ($\epsilon = 20280 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

ES-MS (+) ($\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3 + \text{H}$): 362.1490



• **Compuesto 3.**

Fórmula molecular:

$\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_7$

Peso molecular: 501.15
g/mol

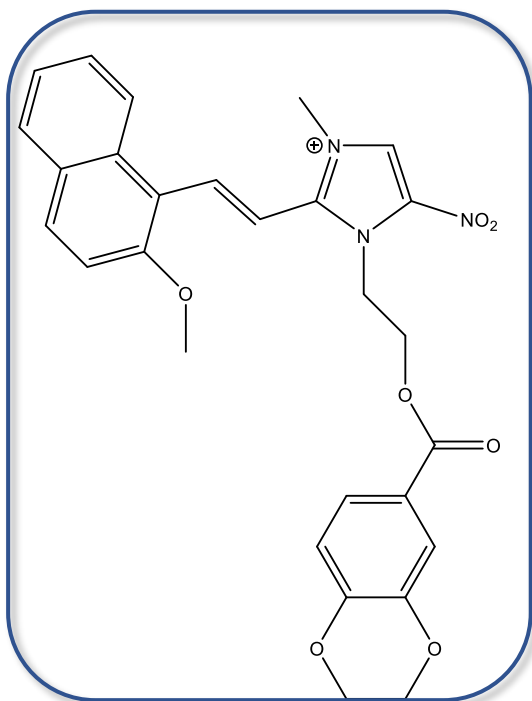
Rendimiento: 78%

^1H NMR (300 MHz, Chloroform- d) δ 8.60 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 8.25 – 8.17 (m, 2H), 7.83 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.77 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 7.60 – 7.52 (m, 1H), 7.52 – 7.46 (m, 1H), 7.43 – 7.33 (m, 3H), 7.29 – 7.22 (m, 2H), 6.53 – 6.47 (m, 1H), 4.88 (dd, $J = 5.6, 4.4$ Hz, 2H), 4.69 (dd, $J = 5.6, 4.4$ Hz, 2H), 4.02 – 3.97 (m, 5H), 3.89 – 3.82 (m, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, Chloroform- d) δ 165.83, 157.18, 152.40, 147.97, 142.96, 135.50, 133.11, 132.91, 131.37, 129.02, 128.65, 127.46, 124.04, 123.54, 123.25, 122.22, 119.21, 116.99, 116.75, 116.34, 112.72, 64.46, 63.76, 63.11, 56.17, 44.68.

UV-Vis (CHCl_3): λ (nm) = 419 ($\epsilon = 16180 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

ES-MS (+) ($\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_7$): 502.1609



- **Compuesto 3Met.**

Fórmula molecular:

$C_{28}H_{26}N_3O_7^+$

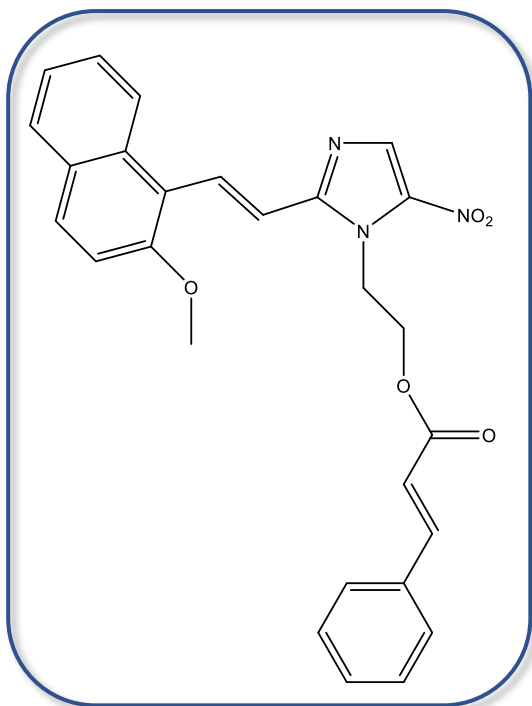
Peso molecular: 516.18
g/mol

Rendimiento: 78%

1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.36 (d, J = 84.2 Hz, 1H), 8.06 – 7.85 (m, 3H), 7.80 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.59 – 7.48 (m, 1H), 7.47 – 7.35 (m, 2H), 7.38 – 7.30 (m, 1H), 7.29 (dd, J = 7.6, 2.0 Hz, 2H), 6.58 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 5.04 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 4.78 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 4.10 (dd, J = 6.6, 3.0 Hz, 4H), 4.07 – 3.95 (m, 5H).

UV-Vis (CHCl₃): λ (nm) = 408 (ϵ =5240 M⁻¹cm⁻¹)

ES-MS (+) ($C_{28}H_{26}N_3O_7^+$): 516.1765



• *Compuesto 4.*

Fórmula molecular:

$C_{27}H_{23}N_3O_5$

Peso molecular:

469.16g/mol

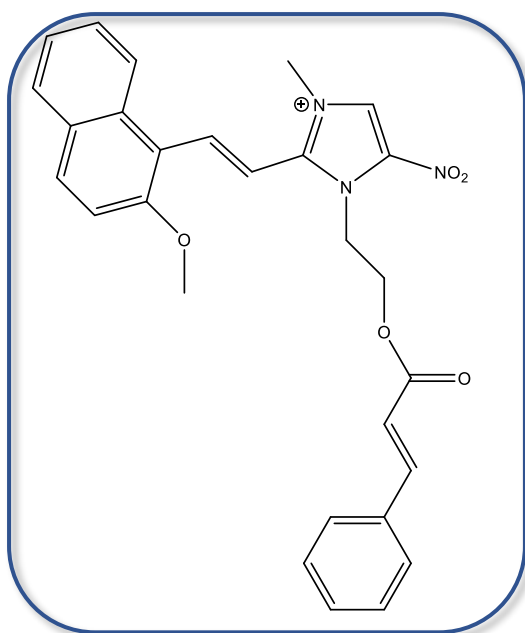
Rendimiento: 27%

1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.79 (d, J = 15.7 Hz, 1H), 8.41 (dd, J = 8.8, 1.0 Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.97 – 7.85 (m, 3H), 7.78 – 7.57 (m, 4H), 7.51 (ddd, J = 8.0, 6.8, 1.1 Hz, 2H), 7.41 – 7.33 (m, 2H), 7.25 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.37 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 4.98 (dd, J = 5.6, 4.5 Hz, 2H), 4.75 (dd, J = 5.7, 4.5 Hz, 2H), 4.14 (s, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 166.48 , 157.04 , 152.17 , 146.07 , 138.59 , 135.18 , 133.83 , 133.09 , 132.97 , 131.61 , 130.47 , 129.13 , 128.78 , 128.07 , 127.65 , 124.14 , 123.18 , 116.98 , 116.75 , 116.56 , 112.72 , 62.92 , 56.26 , 44.62 , 31.07 , 29.84 .

UV-Vis (CHCl₃): λ (nm) = 414 (ϵ =14514 M⁻¹cm⁻¹)

ES-MS (+) (C₂₇H₂₃N₃O₅): 470.1710



- *Compuesto 4Met.*

Fórmula molecular:

$C_{28}H_{26}N_3O_5^+$

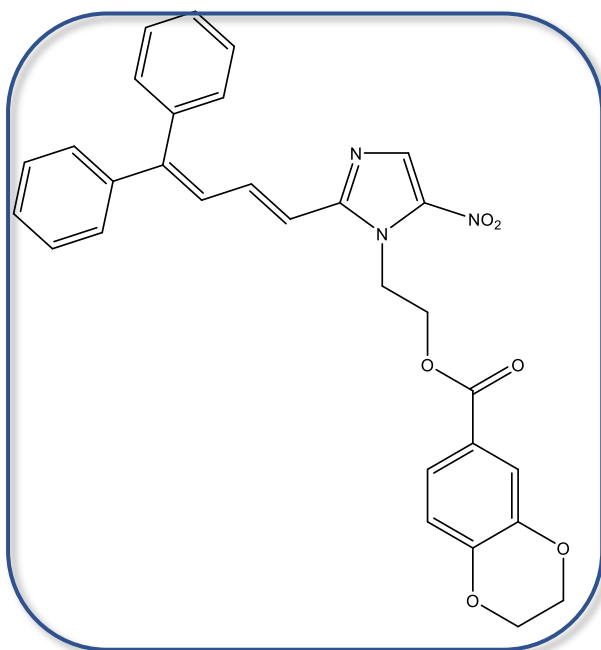
Peso molecular: 484.186
g/mol

Rendimiento: 73%

1H NMR (300 MHz, Chloroform- d) δ 8.65 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.24 (dd, J = 14.8, 7.6 Hz, 2H), 7.91 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.78 (t, J = 8.5 Hz, 2H), 7.51 – 7.30 (m, 6H), 7.15 – 7.08 (m, 2H), 6.25 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 4.86 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 4.62 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 2.17 (s, 3H).

UV-Vis (CHCl₃): λ (nm) = 408 (ϵ =8890 M⁻¹cm⁻¹)

ES-MS (+) (C₂₇H₂₃N₃O₅): 484.1867



- *Compuesto 5.*

Fórmula molecular: C₃₀H₂₅N₃O₆

Peso molecular: 523.17 g/mol

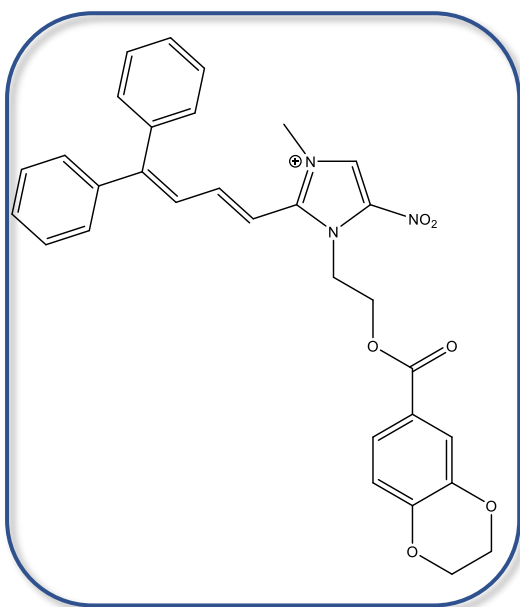
Rendimiento: 60%

^1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.01 (s, 1H), 7.56 – 7.22 (m, 11H), 7.16 – 7.07 (m, 2H), 6.76 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.68 (dd, J = 11.6, 0.8 Hz, 1H), 6.49 (d, J = 14.8 Hz, 1H), 4.75 (dd, J = 5.6, 4.1 Hz, 2H), 4.60 (dd, J = 5.5, 4.1 Hz, 2H), 4.13 – 3.95 (m, 4H).

^{13}C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 165.82 , 150.96 , 149.21 , 148.37 , 143.32 , 141.54 , 138.76 , 138.39 , 138.05 , 135.45 , 130.56 , 128.60 , 128.55 , 128.43 , 128.41 , 128.14 , 126.50 , 123.83 , 122.27 , 119.22 , 117.39 , 116.13 , 77.36 , 64.60 , 64.00 , 63.26 , 44.63 .

UV-Vis (CHCl_3): λ (nm) = 409 (ϵ =20900 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

ES-MS (+) ($\text{C}_{30}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_6$): 524.1816



• *Compuesto 5Met.*

Fórmula molecular: $\text{C}_{31}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_6^+$

Peso molecular: 538.20 g/mol

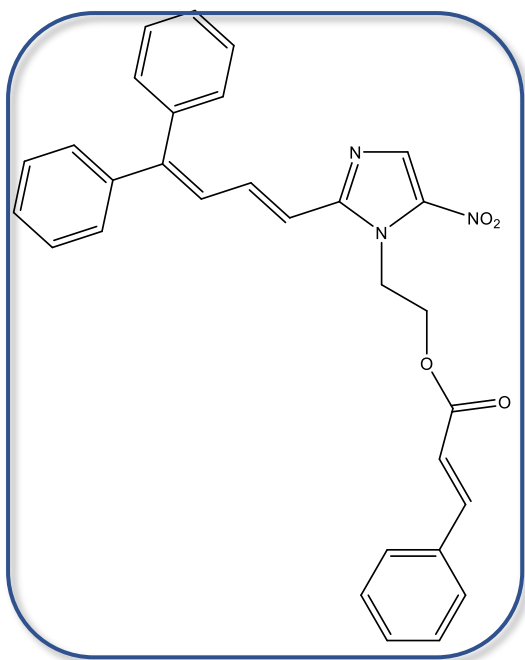
Rendimiento: 98%

^1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.43 (s, 1H), 7.46 – 7.27 (m, 12H), 7.14 – 6.96 (m, 3H), 6.95 – 6.83 (m, 2H), 6.77 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.63 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 4.94 (t, J = 4.9 Hz, 2H), 4.66 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 4.17 – 4.01 (m, 4H).

^{13}C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 165.80 , 155.07 , 148.61 , 146.99 , 146.09 , 143.46 , 139.93 , 137.88 , 137.27 , 130.41 , 129.95 , 129.37 , 128.72 , 128.69 , 126.98 , 124.74 , 123.75 , 121.79 , 119.18 , 117.64 , 108.36 , 77.36 , 64.63 , 64.04 , 62.13 , 48.27 , 38.55 .

UV-Vis (CHCl_3): λ (nm) = 384 (ϵ =18172 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

ES-MS (+) ($\text{C}_{31}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_6^+$): 538.1973



- *Compuesto 6.*

Fórmula molecular: $C_{30}H_{25}N_3O_4$

Peso molecular: 491.18 g/mol

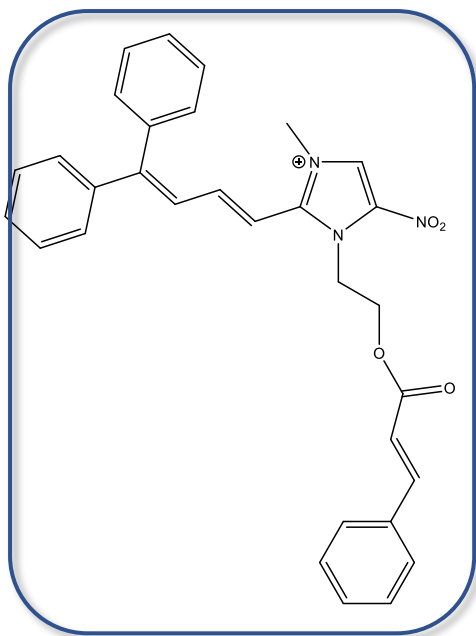
Rendimiento: 20%

1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.06 (s, 1H), 7.71 – 7.53 (m, 2H), 7.48 – 7.42 (m, 3H), 7.39 – 7.27 (m, 8H), 7.25 – 7.05 (m, 5H), 6.86 (dd, J = 11.6, 0.8 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 14.8 Hz, 1H), 6.35 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 4.78 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 4.58 (t, J = 5.1 Hz, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 166.53 , 150.85 , 146.38 , 141.53 , 138.71 , 138.37 , 135.11 , 134.00 , 130.86 , 130.51 , 129.08 , 128.68 , 128.56 , 128.45 , 128.43 , 128.37 , 128.18 , 126.46 , 116.86 , 115.88 , 77.36 , 62.81 , 44.54 , 29.85 .

UV-Vis (CHCl₃): λ (nm) = 410 (ϵ =5760 M⁻¹cm⁻¹)

ES-MS (+) (C₃₁H₂₈N₃O₆⁺): 492.1918



- **Compuesto 6Met.**

Fórmula molecular: $C_{31}H_{28}N_3O_4^+$

Peso molecular: 506.207 g/mol

Rendimiento: 83%

1H NMR (300 MHz, Chloroform- d) δ 8.44 (s, 1H), 7.59 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H), 7.47 – 7.38 (m, 3H), 7.37 – 7.27 (m, 10H), 7.11 – 6.99 (m, 4H), 6.70 (d, $J = 14.6$ Hz, 1H), 6.19 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 4.90 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 4.57 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, Chloroform- d) δ 166.47, 155.34, 147.01, 146.92, 146.19, 139.90, 137.89, 133.81, 131.07, 130.28, 129.99, 129.32, 129.10, 128.73, 128.65, 128.48, 126.92, 124.78, 116.17, 108.49, 77.36, 61.75, 48.09, 38.44, 31.09.

UV-Vis ($CHCl_3$): λ (nm) = 380 ($\epsilon = 17600 M^{-1}cm^{-1}$)

ES-MS (+) ($C_{31}H_{28}N_3O_6^+$): 506.2074

7.3 Descripción detallada de los ensayos biológicos.

7.3.1 Líneas celulares utilizadas

- **HeLa**

Las células HeLa son un tipo particular de células de cultivo celular, usadas en investigación científica. Es el linaje celular humano más antiguo y utilizado con mayor frecuencia. El linaje al cual pertenecen estas células deriva de una muestra de cáncer cérvico-

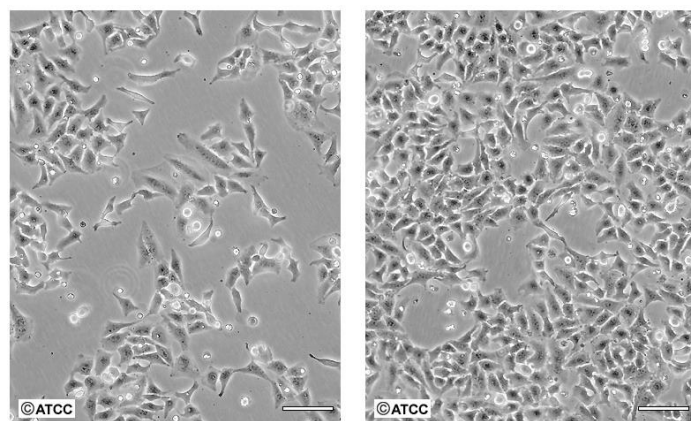


Fig. 20. Células HeLa.

uterino obtenida el 8 de febrero de 1951 de una paciente llamada Henrietta Lacks quien falleció el 4 de octubre de ese mismo año debido al cáncer.

A diferencia de las células no cancerosas, las células HeLa pueden cultivarse en el laboratorio constantemente, de ahí que se haga referencia a ellas como "células inmortales".

El medio en el que crecen mejor es en RPMI 1640 (medio Roswell Park Memorial Institute) suplementado con 10% de FBS (suero fetal bovino) y 1% de antibióticos (Penicilina/Streptomycin 100:1).

- **A549**

Las células A549 son células epiteliales basales alveolares humanas adenocarcinómicas. La línea celular A549 se desarrolló por primera vez en 1972 por D. J. Giard, a través de la extirpación y cultivo de tejido pulmonar canceroso en el tumor de un varón caucásico de 58 años.

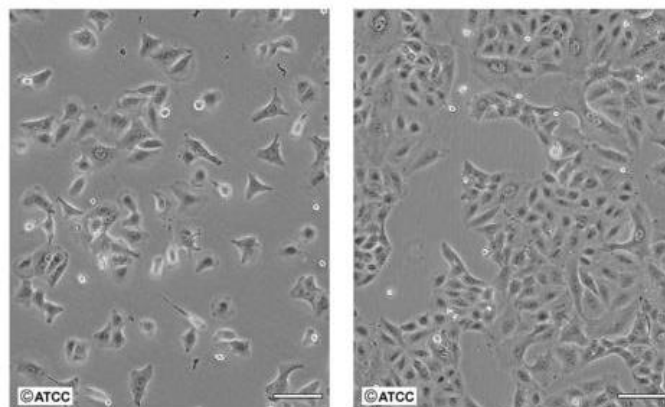


Fig. 21. Células A549.

En la naturaleza, estas células son escamosas y responsables de la difusión de algunas sustancias, como agua y electrolitos, a través de los alvéolos de los pulmones.

Si las células A549 se cultivan in vitro, crecen como células monocapa, adheridas o unidas al matraz de cultivo. La línea de células epiteliales alveolares humanas A549 puede anclarse o suspenderse en una solución in vitro. La línea celular A549 se usa ampliamente como un modelo in vitro para un modelo de células epiteliales pulmonares tipo II para el metabolismo farmacológico y como un hospedador de transfección.

El medio normal de crecimiento para mantener esta línea celular se suplementa con 5% FBS y 1% de antibióticos (Penicilina/Streptomycin 100:1).

7.3.2 Pases de las células

Primero se comprueba que las células que se habían puesto a crecer (72 horas) están listas para cambiarse de un frasco a otro, esto se hace a través del microscopio. Se va mirando todo el frasco y se estima la ocupación del frasco dando un valor de porcentaje aproximado.

Si este valor es alto, se trasladan las células a otro frasco para que de esta manera puedan seguir creciendo. Este proceso se realiza en campana de flujo laminar, y en condiciones estériles para evitar la contaminación de las líneas celulares (lámpara de UV 15 minutos antes y flujo de aire filtrado). Para este proceso se requiere del medio en el que se cultivan las células, el cual esta compuesto de un medio RPMI 1640 enriquecido al 10%. A su vez, se emplea tripsina para separar las células adheridas en el fondo de los frascos de cultivo. Los reactivos se encuentran a 4°C y por lo que deben ponerse a calentar a 37°C en un baño antes de su uso.

Secuencia de pasos a seguir:

- Lavado de las células con 3 ml de PBS (x2).
- Adición de 500 µL de tripsina para separarlas del frasco y reposo de 4-5 minutos en la incubadora en condiciones óptimas (el tiempo es variable en función de la línea celular). Pasado este tiempo, separación de las células por suave golpeo del frasco. Comprobación de la separación por observación bajo microscopio (las células adquieren una forma redondeada).
- Adición de 3,5 mL de medio enriquecido al 10% obteniendo un volumen final de 4 mL para parar el efecto de la tripsina.
- Cálculo de la dilución necesaria para la conservación de las células hasta el siguiente pase o ensayo.
- Pipeteo de la cantidad calculada de células al nuevo frasco.
- Adición hasta un volumen final de 4 mL del medio RPMI enriquecido al 10%.

- Almacenamiento a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂, y un nivel de humedad del 85%.

7.3.3 Prueba de solubilidad

Días antes del ensayo se comprobó si los compuestos eran solubles en el medio. Para ello se realizaron disoluciones stock en DMSO a 16mM.

Tabla 4. Preparación de las disoluciones stock de DMSO para los compuestos **3Met** y **5Met**.

Compuesto	Peso molecular	Masa (mg)	Volumen de DMSO utilizado (mL)
3Met	516.1765	41	4.965
3Met-Irradiado	516.1765	31	3.753
5	538.1973	29	3.367
5Met-Irradiado	538.1973	21	2.439

A partir de estas disoluciones stock se hicieron diluciones 1:40 en medio de cultivo (RPMI 1640 + 10% FCS). Para ello, se tomaron 15 µL de estas disoluciones y se llevaron a 585 µL del medio.

Todos los compuestos fueron solubles en el medio.

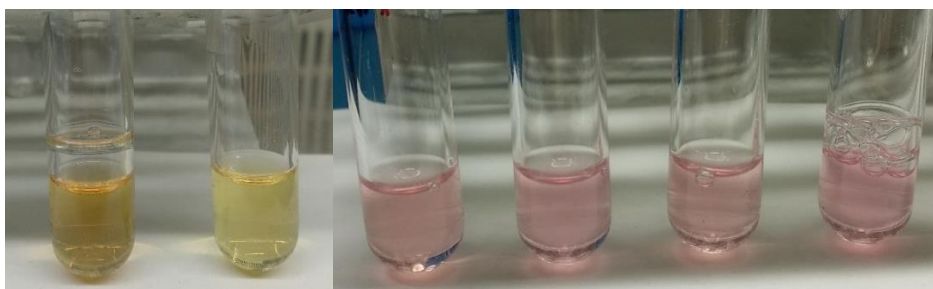


Fig. 22. Disolución de los compuestos en DMSO (izq.) y en medio de cultivo (dcha.).

7.3.4 Contaje en cámara de Neubauer

En primer lugar, en una campana de flujo laminado se lavó el frasco con las células con 3 mL de PBS (x2) y después se añadieron 500 μ L de tripsina. Se dejó a 37°C cinco minutos para que las células se despegasen del frasco y se añadieron 3,5 mL de medio (5% para A549 y 10% para HeLa) RPMI para parar el efecto de la tripsina ya que si se prolonga su efecto puede llegar a ser perjudicial para las células.

En un Eppendorf se mezclaron 200 μ L de células recién preparadas, 200 μ L de azul tripan y 600 μ L de PBS (dilución 1:5). Posteriormente se cargaron 10 μ L en la cámara de Neubauer (hemocitómetro cubierto con el cubreobjetos) y se contaron las células que había en cada uno de los cuatro cuadrantes 4x4 de arriba y de abajo (luego se cogió el resultado de la media).

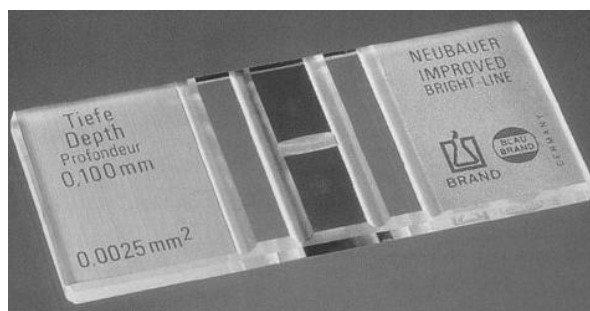


Fig. 23. Cámara de Neubauer.

El número que resultó corresponde a la cantidad de células en 10^4 mL. Además, como se había realizado una dilución 1:5, se tuvo en cuenta este factor de dilución.

Al final, se lava el hemocitómetro con agua normal y se seca sobre un paño de papel.

7.3.5 Preparación de las células para los ensayos

Se realizó un cálculo de la cantidad de células que se necesitaban para el proceso.

En cada pocillo se añaden 50 μL de células quedando una concentración de 1500 céls/pocillo, en 100 μL (volumen final) habrá 3000 céls/100 μL (3×10^4 céls/mL).

Hay que rellenar 60 pocillos con 50 μL /pocillo, lo que supone 3 mL de células por placa más un extra (3,5 mL). Se utilizan 4 placas por línea, por lo tanto se necesitan 14 mL. Teniendo en cuenta las células/mL obtenidas del conteo en la cámara Neubauer y los mililitros necesarios se obtiene el valor de las células necesarias para las 4 placas, finalmente pudiendo calcular los mililitros de células necesarios para cada pocillo.

Como se necesitaban 14 mL, en un falcón de 15 mL, se añaden 0.715 mL de células en 13.285 mL de medio RPMI enriquecido al 5% de FBS (para A549). Para lograr tener la concentración deseada de células en cada pocillo (1500 células por pocillo).

7.3.6 Plaqueo de las células

En primer lugar, se añadieron con ayuda de la pipeta multicanal, 100 μL de medio a los pocillos más externos de la placa, esto se realiza para evitar el efecto borde (temperatura y toxicidad).

Tras esto, se adicionaron 50 μL de células en crecimiento, con una densidad aproximada de $1,5 \times 10^3$ células por pocillo en la placa de 60 pocillos creciendo en un medio enriquecido al 5% de FBS en las A549 y 10% en HeLa 24 horas antes de añadir el compuesto a estudiar (no en los pocillos que dan al exterior).

Al día siguiente se añadieron los compuestos a estudiar en concentraciones crecientes.

7.3.7 Plaqueo de los compuestos

Tras dejar a las células 24 horas creciendo en la placa, se prepararon en Eppendorfs de 2 mL todas las diluciones que se añadieron a la placa.

Se pretendía evaluar el rango de concentraciones de 200 μM a 0,78 μM realizando diluciones 1:2. Para ello, se realizó una disolución madre a partir de las preparadas anteriormente a 16 mM.

En un Eppendorf de 2 mL se añaden 45 μL del compuesto a 1755 μL del medio (RPMI al 10% en HeLa y al 5% en A549). Como hay cuatro compuestos y dos líneas, se necesitó preparar cada compuesto por duplicado en cada medio, es decir, en 8 Eppendorfs de 2 mL cada disolución de 400 μM (Eppendorf I).

De este Eppendorf se cogieron 1200 μL y se pasaron al siguiente (concentración final de 200 μL al ponerlo en el pocillo). Este paso se repitió para todos los Eppendorfs.

Finalmente se añadieron 50 μL de cada dilución al pocillo correspondiente de la placa, los cuales contenían ya 50 μL de células en el medio adecuado.

Además, se añadieron 50 μL de medio en los pocillos que eran de control para conseguir un volumen final de 100 μL .

Tabla 5. Disoluciones seriadas.

Volumen a traspasar (μL)	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200
Disolución [μM]	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
V_{medio} (μL)	1755	600	600	600	600	600	600	600	600
V_{total} (μL)	1800	1800	1800	1800	1800	1800	1800	1800	1800

Las placas se dejaron incubar durante 72 horas.

7.3.8 Ensayo MTT

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado (formazan¹⁹), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas.

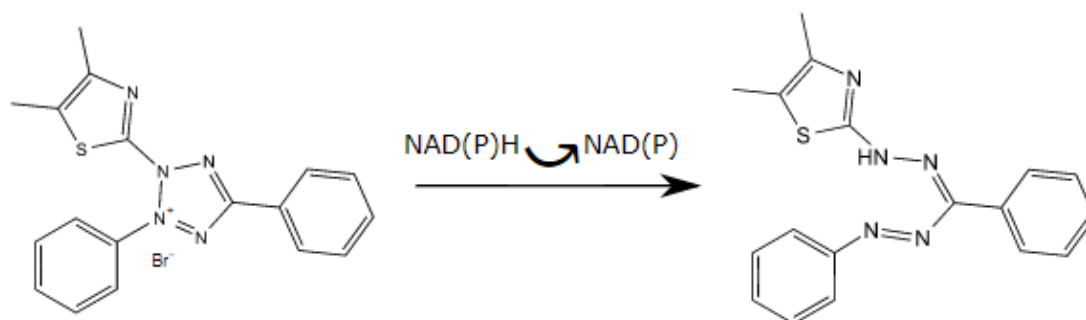
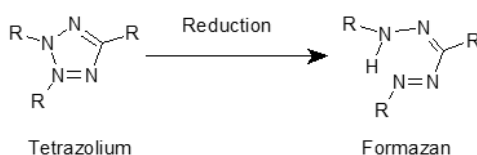


Fig. 24. Reacción de reducción del MTT (amarillo) para dar lugar a un compuesto de la familia de los formazanos (marrón).

Tras 72 horas se añadieron 20 μL de MTT en cada pocillo de la placa donde hay células y se dejaron una hora en la incubadora bajo condiciones controladas.

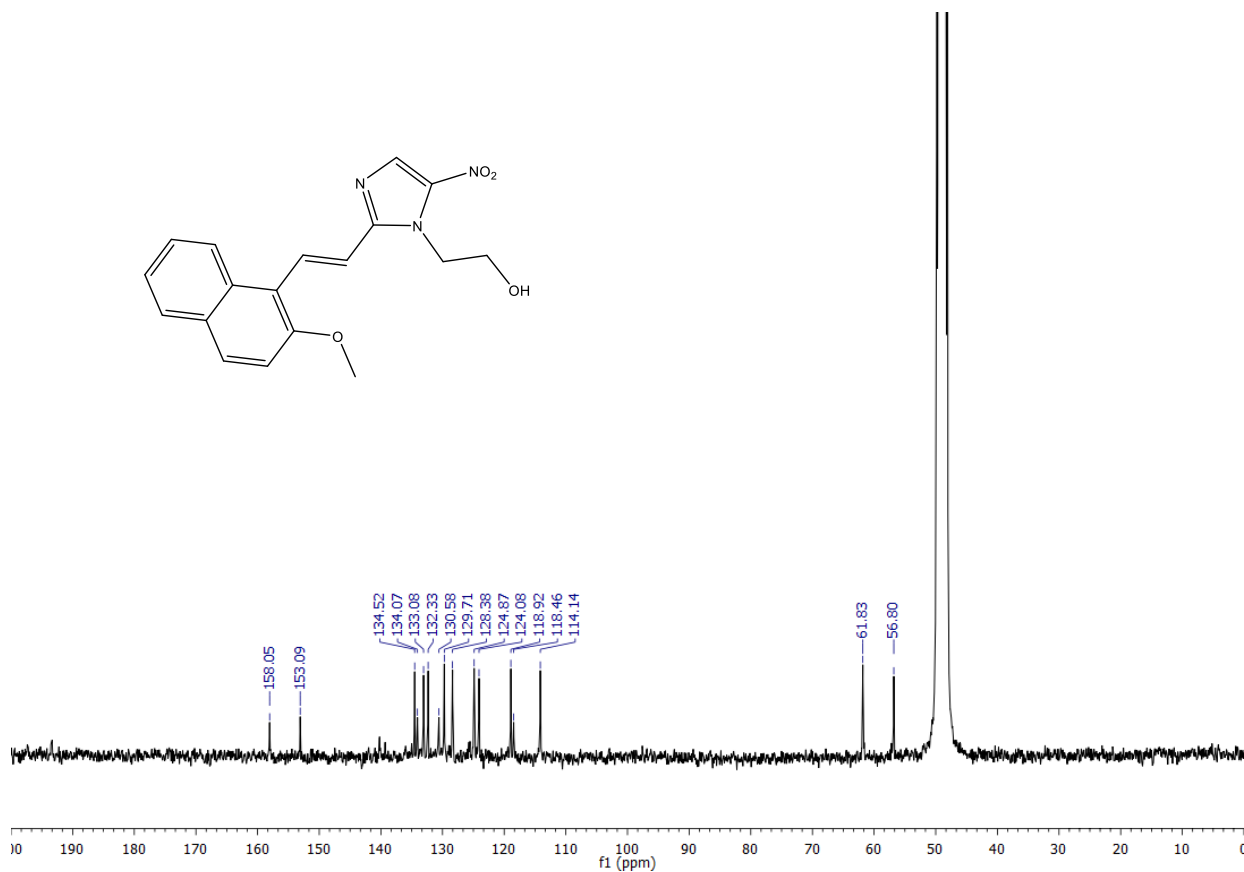
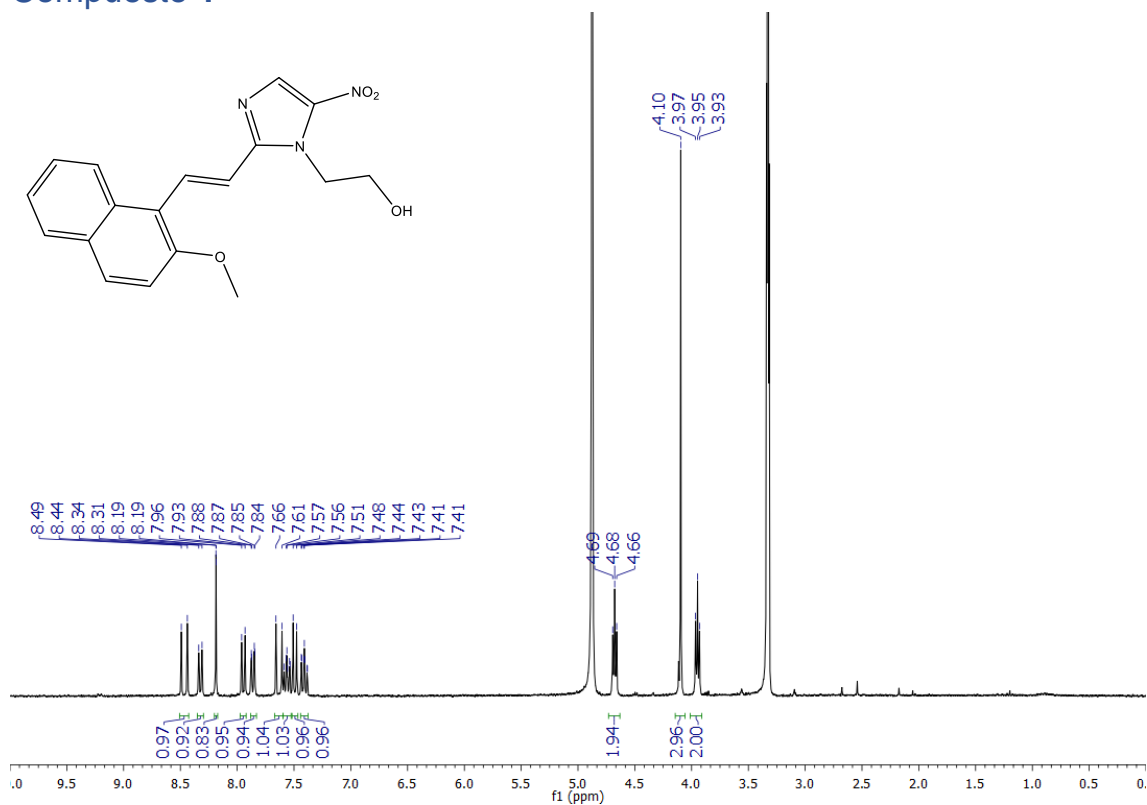
Una vez transcurrido ese tiempo, se midió la absorbancia a 490nm con el fin de conocer la concentración de células que hay en cada pocillo.

¹⁹ Producto cromogénico artificial de la reducción de sales de tetrazolio por deshidrogenasas y reductasas. Tienen una variedad de colores desde el azul oscuro hasta el rojo intenso, dependiendo de la sal de tetrazolio original utilizada como sustrato para la reacción.

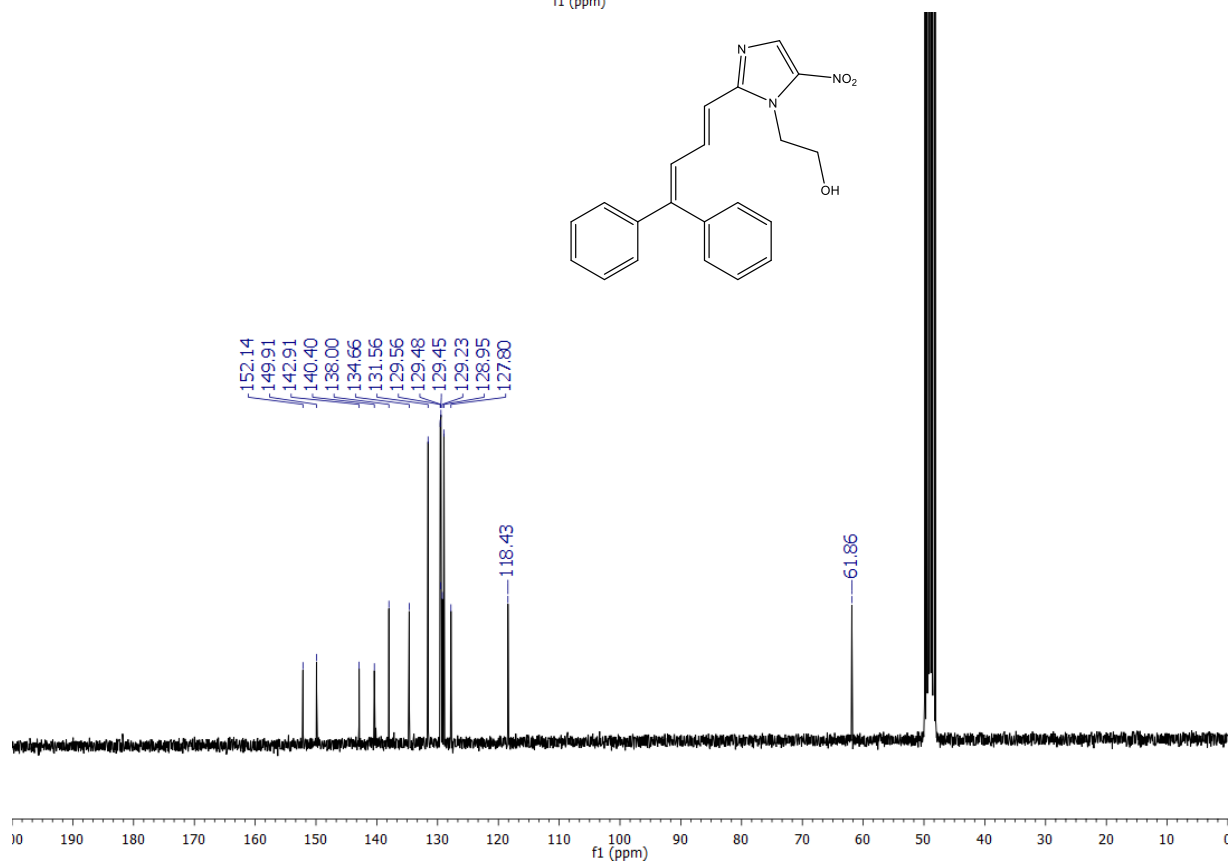
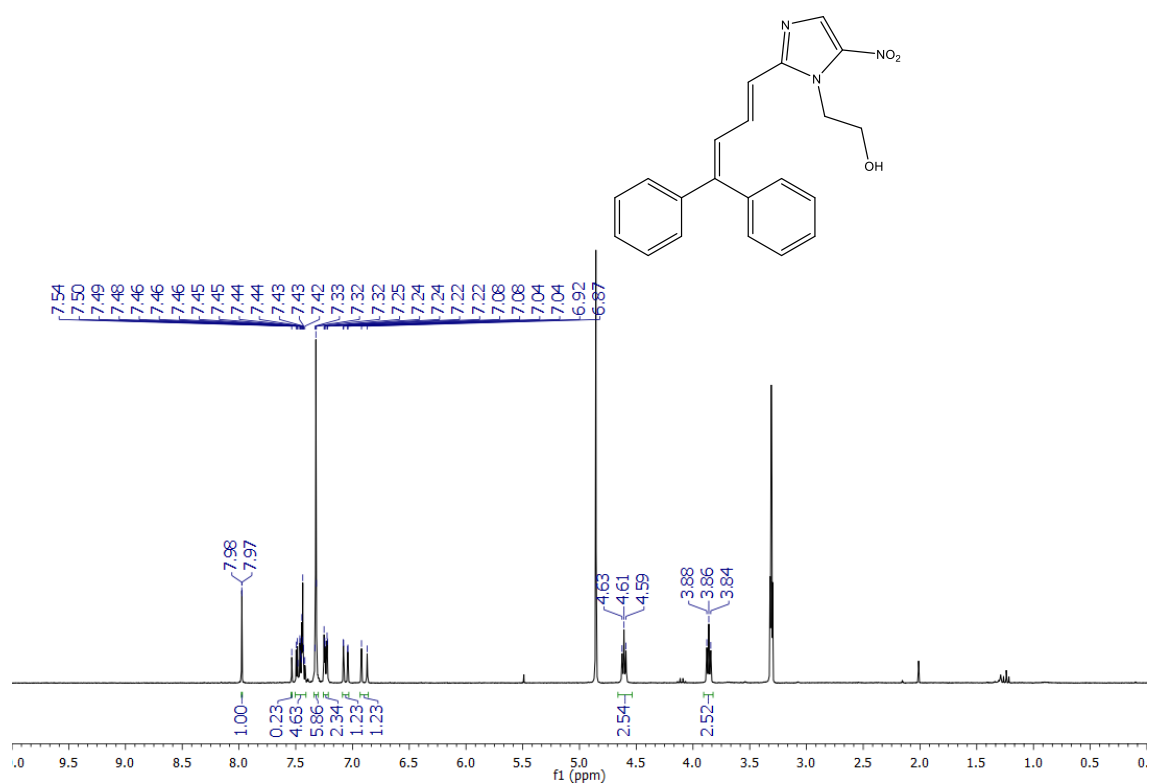


8. Anexo

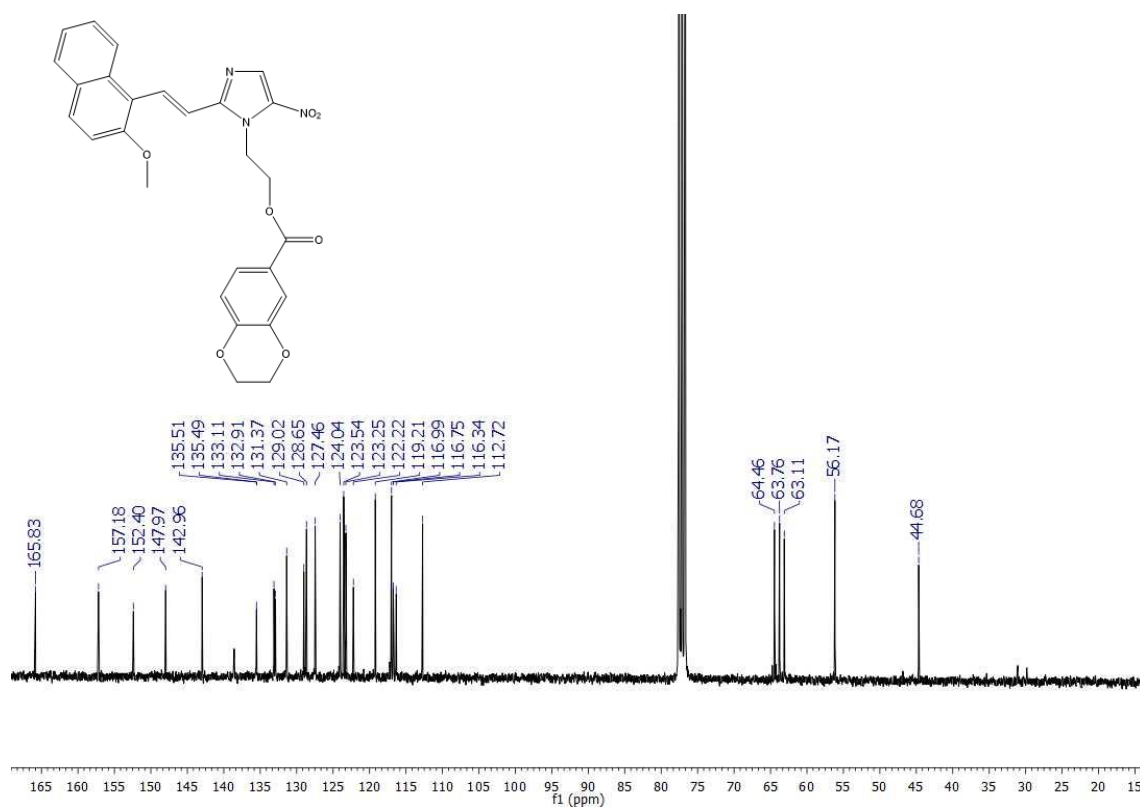
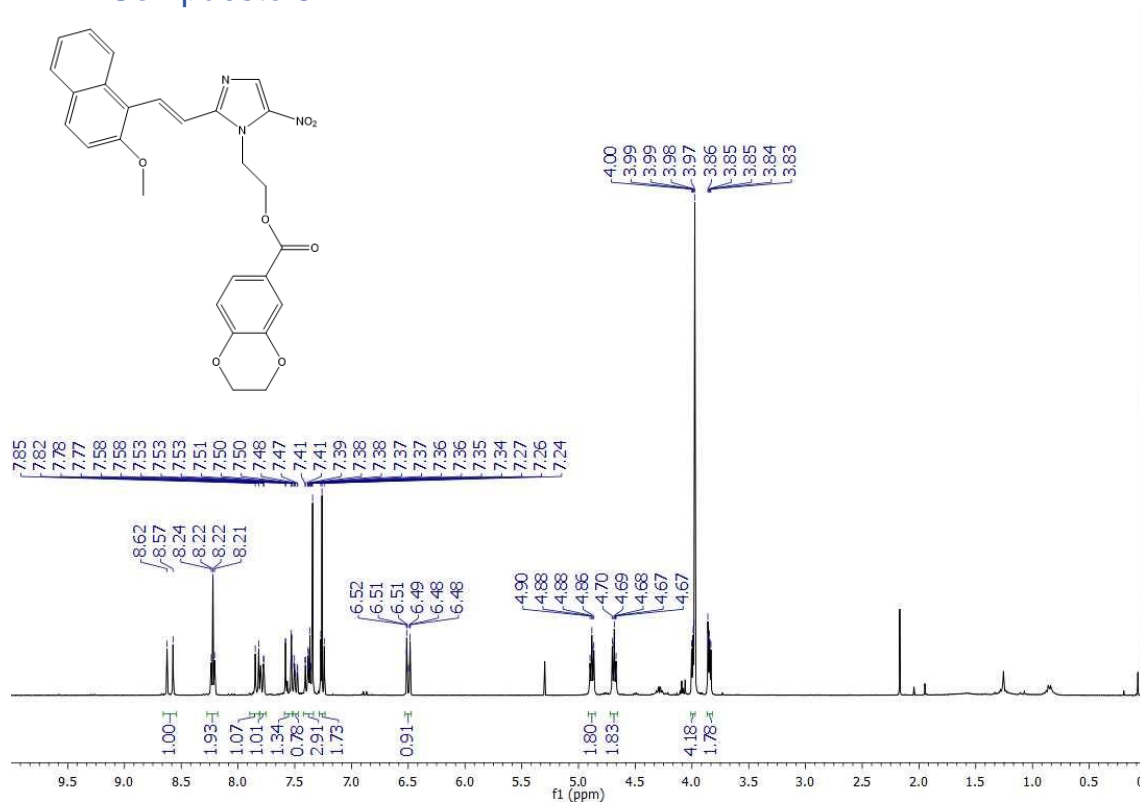
• Compuesto 1



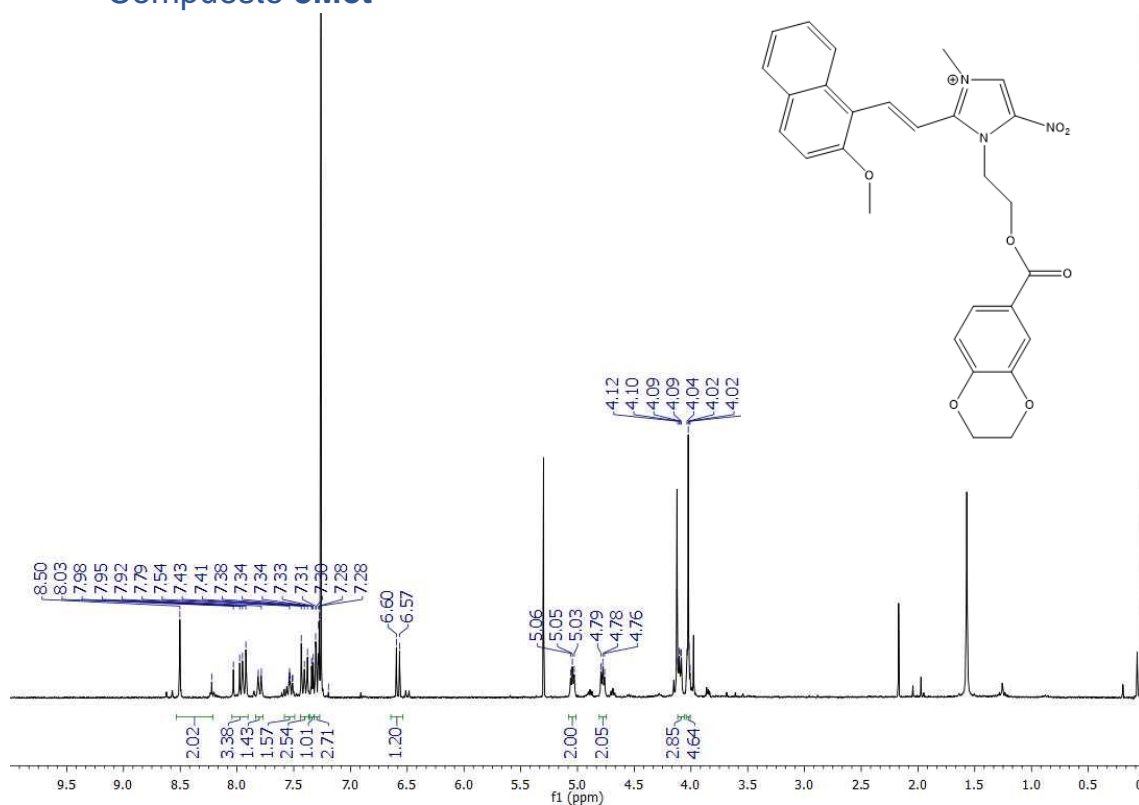
• Compuesto 2



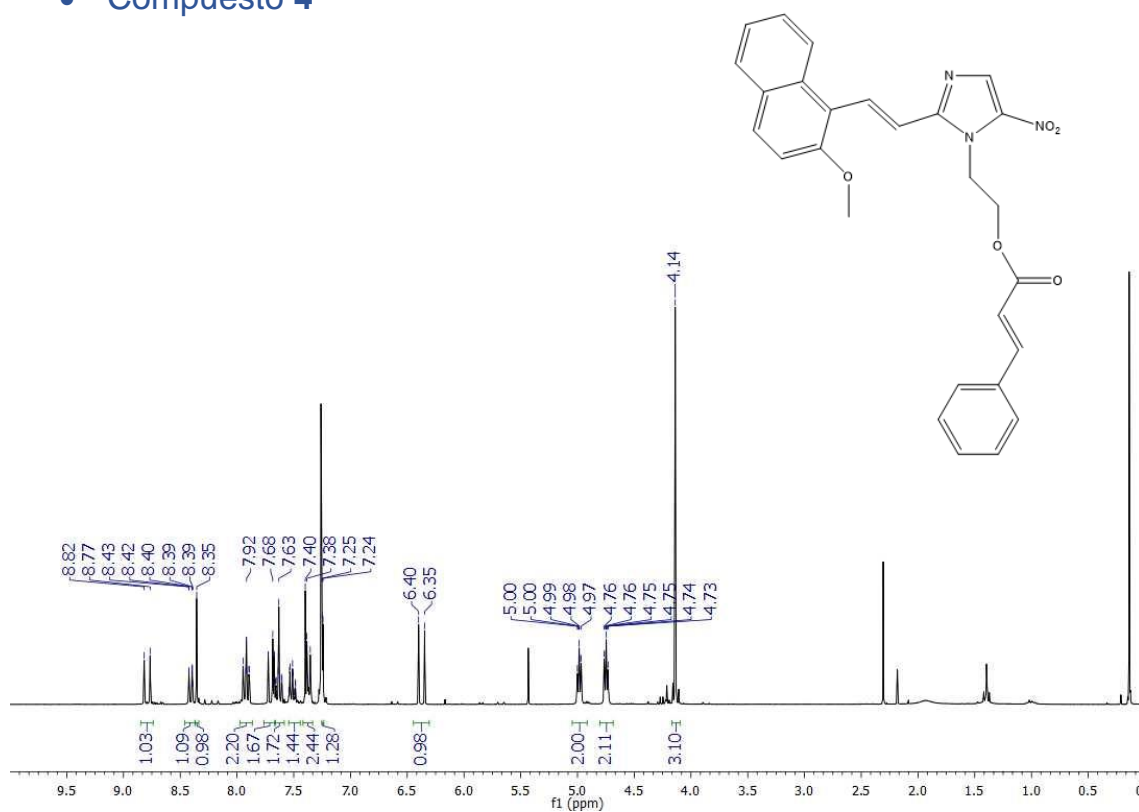
• Compuesto 3

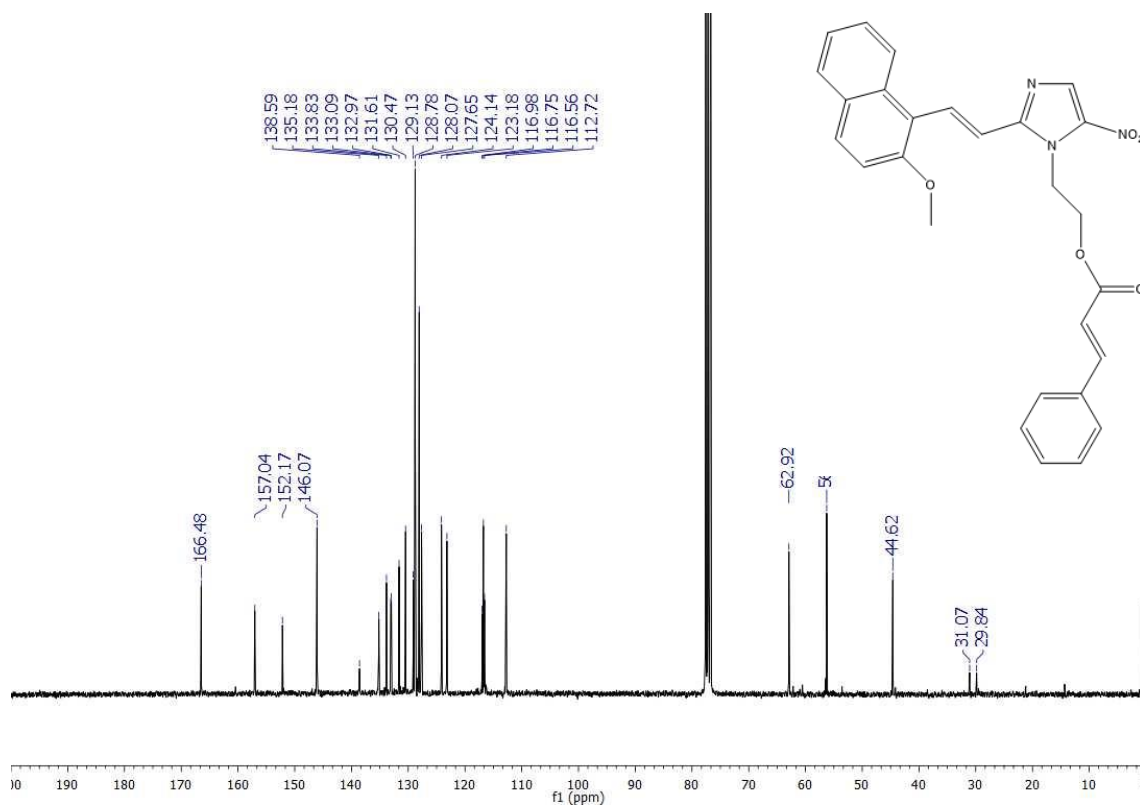


• Compuesto 3Met

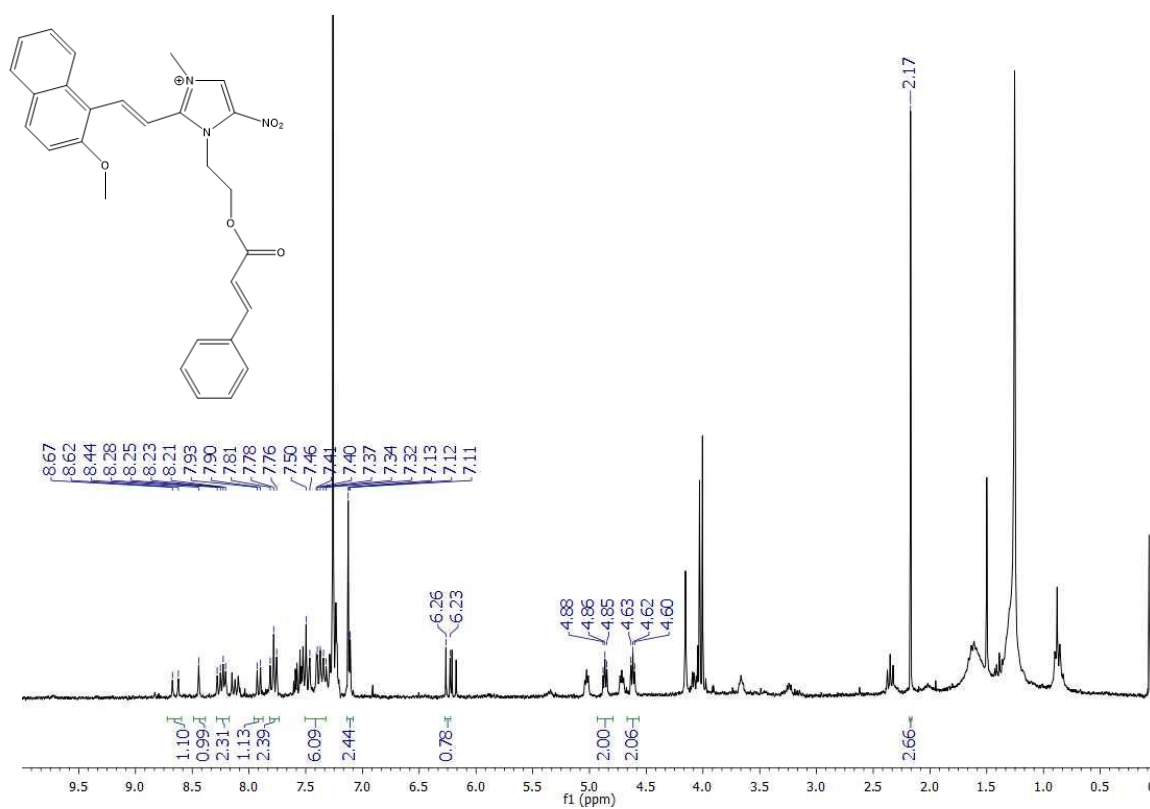


• Compuesto 4

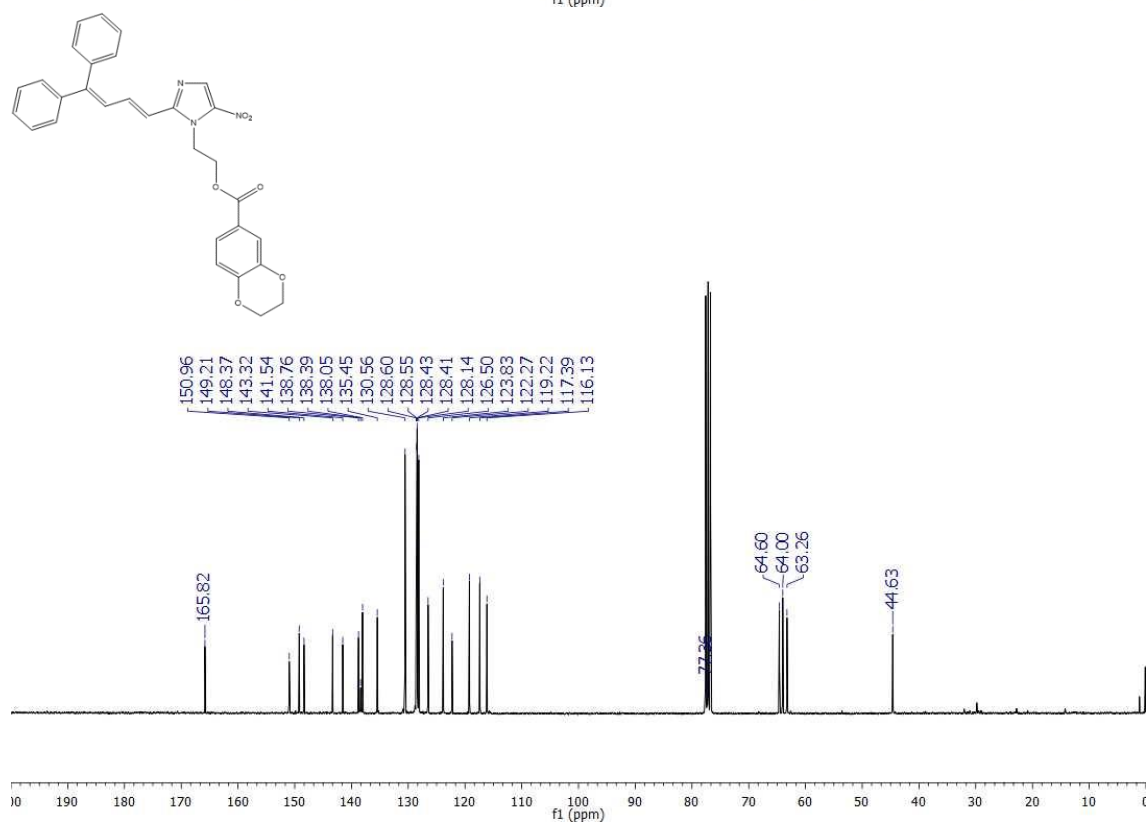
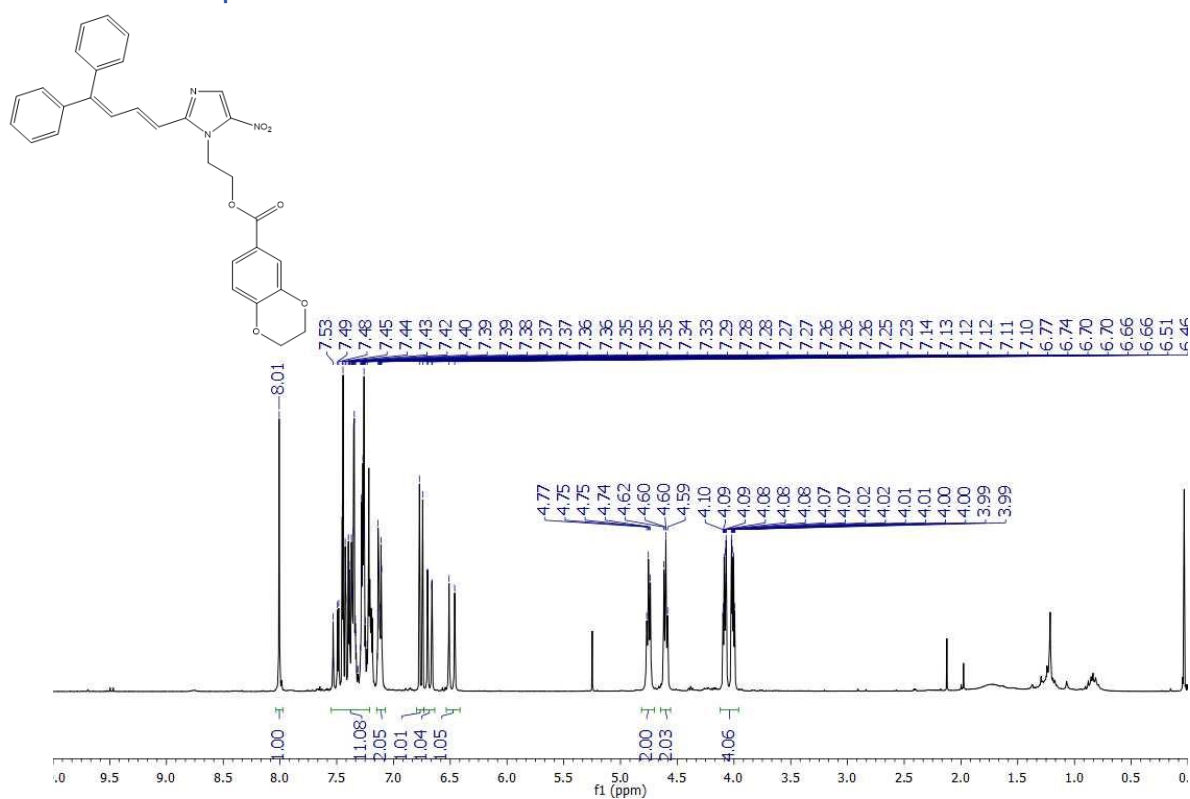




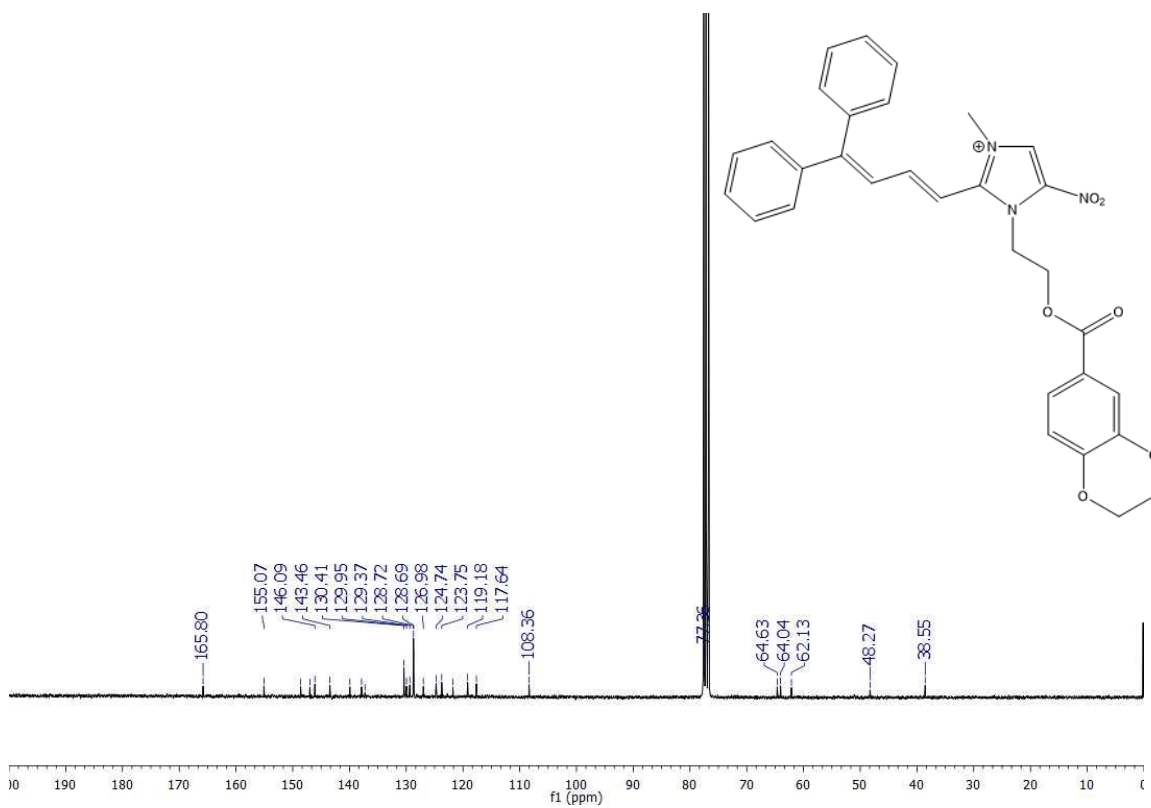
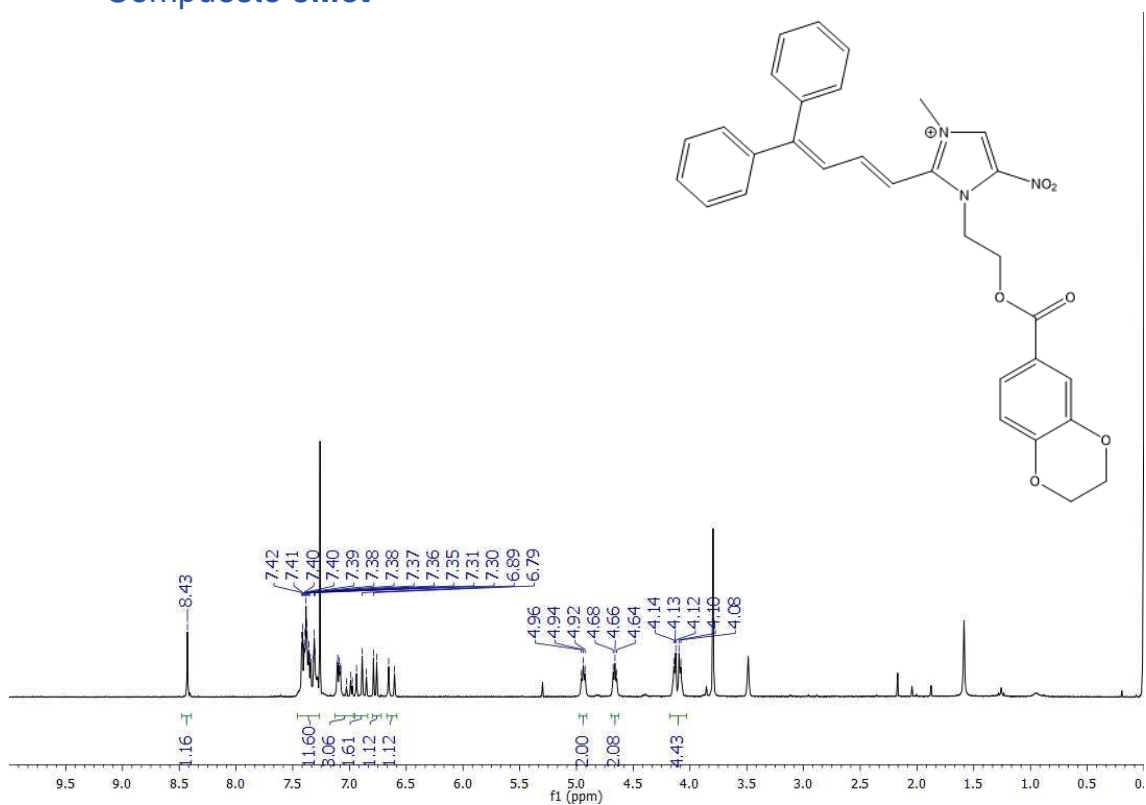
- Compuesto 4Met



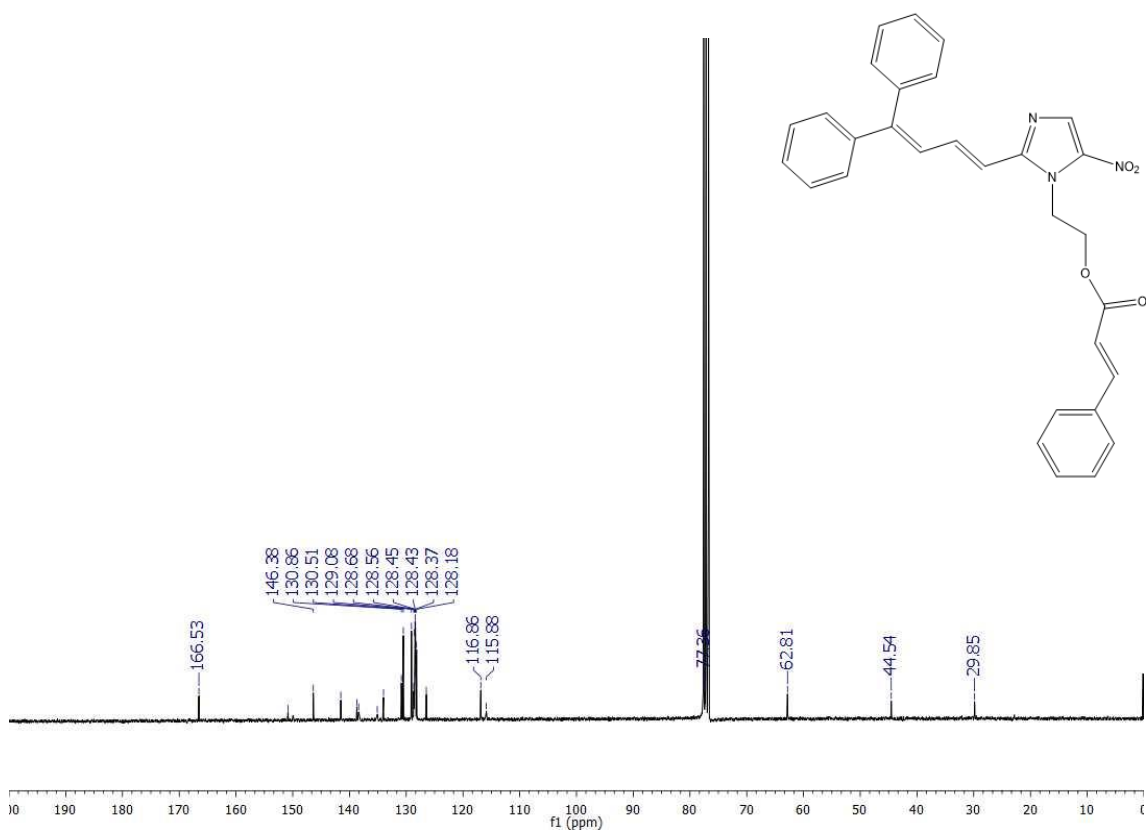
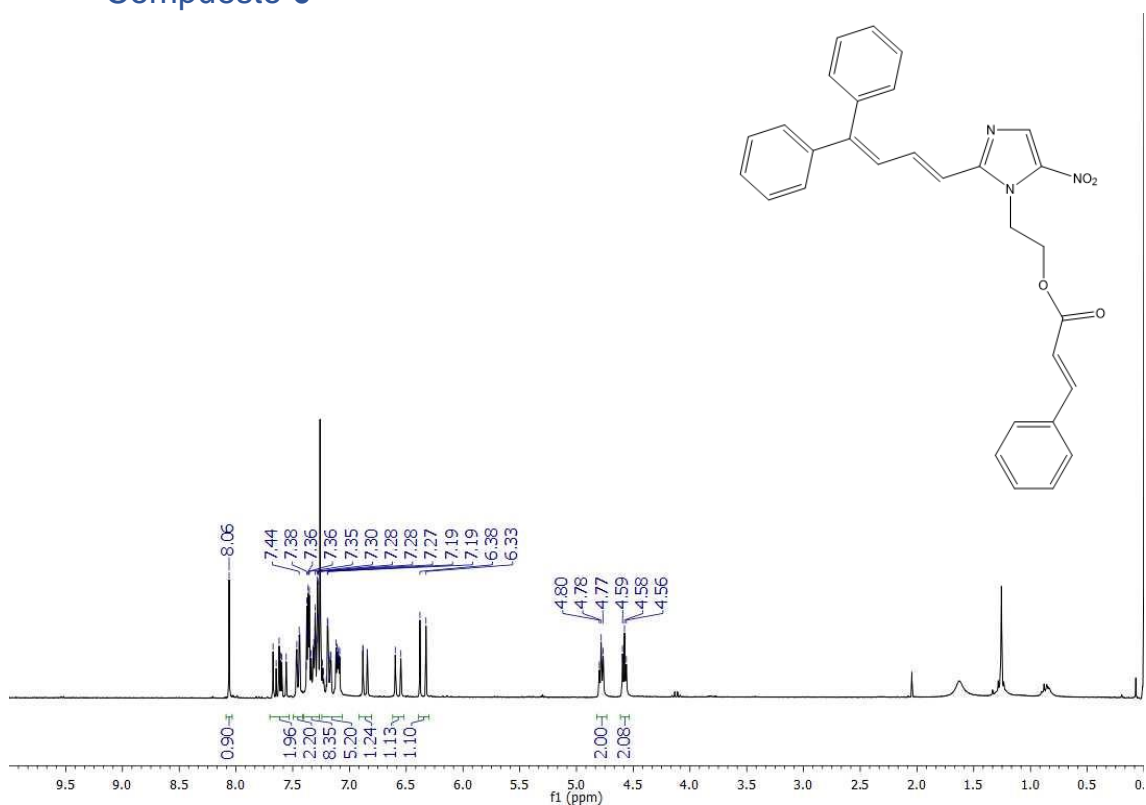
• Compuesto 5



• Compuesto 5Met



• Compuesto 6



• Compuesto 6Met

